

DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA MATERNO-INFANTILE E DELL'ETÀ EVOLUTIVA
E FISIOPATOLOGIA DELLA FUNZIONE SESSUALE

Ciclo XXII

Settore scientifico disciplinare di afferenza
MED 38 PEDIATRIA GENERALE SPECIALISTICA

SINDROME DI DOWN E FATTORI DI RISCHIO
NEL DECLINO NEUROCOGNITIVO

Presentata da:

Dott.ssa MARILU' CAPELLI

Coordinatore Dottorato:

Chiar.mo Prof. GIUSEPPE PELUSI

Relatore:

Chiar.mo Prof. GUIDO COCCHI

Esame finale anno 2010

INDICE GENERALE

INTRODUZIONE

1. LA SINDROME DI DOWN: ASPETTI EPIDEMIOLOGICI	Pag. 2
2. LA SINDROME DI DOWN: ASPETTI CITOGNETICI	Pag. 7
2a La genetica delle cardiopatie congenite nella Sindrome di Down	Pag. 7
2b La genetica dei dismorfismi craniofaciali nella Sindrome di Down	Pag. 7
2c La genetica dei disordini mieloproliferativi nella Sindrome di Down	Pag. 7
3. LA SINDROME DI DOWN: ANOMALIE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE E DISABILITA'	Pag. 8
4. DEGENERAZIONE NEURONALE ED INVECCHIAMENTO PRECOCE NELLA SINDROME DI DOWN	Pag. 10
5. LA SINDROME DI DOWN E LA MALATTIA DI ALZHEIMER: FATTORI DI RISCHIO E CORRELAZIONE NEUROBIOLOGICA	Pag. 11
6. CORRELAZIONE FRA DEFICIT IMMUNITARI ED INVECCHIAMENTO PRECOCE NELLA SINDROME DI DOWN	Pag. 14
7. LO STRESS OSSIDATIVO, LE MUTAZIONI DEL DNA MITOCONDRIALE E L'INVECCHIAMENTO PRECOCE NELLA SINDROME DI DOWN	Pag. 15
8. ALTERAZIONI DEL METABOLISMO DELL'OMOCISTEINA ED IPERURICEMIA NELLA SINDROME DI DOWN: CORRELAZIONE CON LO STRESS OSSIDATIVO	Pag. 19

OGGETTO DI STUDIO

1. SINDROME DI DOWN E FATTORI DI RISCHIO NEL DECLINO NEUROCOGNITIVO	Pag. 23
2. MATERIALI E METODI	Pag. 23
3. RISULTATI	Pag. 38
3.1 PARAMETRI BIOCHIMICI	
3.2 VALUTAZIONI NEUROCOGNITIVE, PSICOLOGICHE E PSICHIATRICHE	Pag. 43
3.3 GENOTIPIZZAZIONE APOE4	Pag. 51
4. PROSPETTIVE FUTURE	Pag. 53

CONCLUSIONI

Pag. 55

BIBLIOGRAFIA

Pag. 58

INTRODUZIONE

1. LA SINDROME DI DOWN: ASPETTI EPIDEMIOLOGICI

La sindrome di Down (DS) o trisomia 21 rappresenta la più comune e nota cromosomopatia, determinata dalla presenza in triplice copia del cromosoma 21 (Hsa21) o, più raramente, di parte di esso, in seguito ad una mancata disgiunzione meiotica durante l'ovogenesi. L'origine del cromosoma 21 sovranumerario è materna nel 93% dei casi, mentre nel 7% dei casi è dovuta alla non disgiunzione del cromosoma di origine paterna.

Nel 95% dei casi si tratta di trisomia 21 in forma libera, che consiste nella presenza in soprannumero dell'intero Hsa21, non traslocato su altri cromosomi; nella maggioranza dei casi la trisomia 21 è omogenea, ovvero presente in tutte le cellule analizzate, mentre nel 3,5% dei pazienti è in mosaico, quindi presente solo in parte delle cellule. Nel 4% dei casi la trisomia 21 è dovuta ad una traslocazione di Hsa21 su un altro cromosoma (traslocazione robertsoniana); infine nell'1% dei pazienti la trisomia 21 è parziale.

Dal punto di vista clinico l'effetto è identico, mentre le conseguenze riproduttive (rischio di ricorrenza) per la coppia genitoriale sono in relazione al tipo citogenetico di trisomia 21.

Per la diagnosi di DS, è necessaria quindi la presenza di trisomia 21 in associazione al quadro clinico.

L'incidenza stimata di DS è circa 1/700 – 1/1000 nati vivi, con una lieve prevalenza nel sesso maschile ⁽¹⁾: il numero annuale di nati affetti da DS risulta essere in diminuzione a causa soprattutto delle interruzioni volontarie di gravidanza (IVG) selettive; i registri delle IVG evidenziano un progressivo incremento negli anni di interruzioni volontarie per DS e si stima che la percentuale di IVG, rispetto ai nati, sia circa 58%.

L'unico fattore di rischio accertato per DS è rappresentato dall'età materna avanzata, responsabile di alterazioni nel processo di meiosi (M) degli ovociti, in particolare della nondisgiunzione meiotica di Hsa21 ⁽²⁾, sia durante la fase I (MI), che nella fase II (MII); la percentuale di errori di MI e MII varia in base all'età materna: è più bassa nelle madri con età < 19 e ≥ 40 anni e più elevata nel gruppo intermedio e, nelle donne con età ≥ 40 anni, è più frequente la nondisgiunzione in MII ⁽³⁾.

La trisomia 21 comporta un elevato rischio di abortività spontanea e di morbidità e mortalità neonatali: nel periodo compreso tra l'epoca della villocentesi ed il termine di gestazione la percentuale di aborti spontanei è del 43%, mentre tra l'epoca dell'amniocentesi ed il termine di gestazione è del 23% ⁽⁴⁾. In letteratura è riportata una correlazione direttamente proporzionale tra età materna ed incidenza di aborti spontanei di feti affetti da DS: con l'aumentare dell'età materna, cresce l'incidenza di aborti spontanei (dal 23% per le madri all'età di 25 anni al 45% per quelle di 45 anni) ⁽⁵⁾.

Negli ultimi anni la qualità e l'aspettativa di vita dei pazienti affetti da DS sono significativamente migliorate, grazie ai continui progressi nei trattamenti medici: è aumentata soprattutto la sopravvivenza nella prima infanzia, conseguentemente al perfezionamento della cardiocirurgia, ed i soggetti affetti da DS più anziani raggiungono i 73 anni di età; l'aspettativa di vita per i maschi è maggiore di circa 3.3 anni rispetto alle femmine; un prolungamento della vita comporta tuttavia un aumento di percentuale delle patologie legate all'invecchiamento ⁽⁶⁾.

2. LA SINDROME DI DOWN: ASPETTI CITOGENETICI

Molti studi sono stati volti per individuare le conseguenze fenotipiche e cliniche legate al triplo dosaggio genico dovuto alla trisomia 21.

Recentemente il cromosoma 21 è stato completamente sequenziato. I geni presenti su Hsa21, fino ad ora identificati, sono più di 400 ⁽⁷⁾; di questi 20-50 sono localizzati nel tratto terminale del braccio lungo (21q22.2), definito Down syndrome critical region (DSCR).

Si ritiene che lo sbilanciamento di espressione tra geni Hsa21 e geni nonHsa21 sia responsabile delle molteplici caratteristiche fenotipiche di DS.

Solo alcuni geni sembrano essere sensibili alla sovraespressione legata alla presenza della triplice copia di Hsa21 stesso, con conseguente alterazione del fenotipo da essi determinato.

I geni di Hsa21 in triplice copia hanno un effetto integrato sull'intero genoma e condizionano l'espressione di moltissimi altri geni, attivandoli o inibendoli a seconda della costituzione genetica individuale (polimorfismo genico): questo potrebbe spiegare la variabilità di espressione fenotipica e la diversità individuale di manifestazioni patologiche nei pazienti affetti da DS.

La trisomia di Hsa21 ha un notevole impatto sullo sviluppo di diversi organi e tessuti, in particolare di cuore e cervello.

Negli ultimi anni sono stati compiuti notevoli progressi nella conoscenza e nella spiegazione dei meccanismi genetici alla base delle principali caratteristiche fenotipiche della DS: anomalie di sviluppo, predisposizione a determinate patologie, disabilità. Queste conoscenze possono avere un ruolo fondamentale in nuove strategie terapeutiche.

Hsa21 contiene 5 microRNAs (miRNA) regolatori dell'espressione genica: miR-99a, let-7c, miR-125b-2, miR-155, and miR-802; la sovraespressione di questi miRNA, in presenza di trisomia 21, a livello dei tessuti nervoso e cardiaco fetali, determina una ridotta espressività delle proteine codificate (effetto down-regulation): ne conseguono le anomalie cerebrali e cardiache tipiche della DS.⁽⁸⁾

Recentemente sono stati identificati due principali geni nella DSCR, coinvolti in varie anomalie di sviluppo: DYRK1A (dualspecificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A), responsabile della fosforilazione di molteplici fattori di trascrizione (FIG.1), e RCAN1 (regulator of calcineurin 1), inibitore endogeno della calcineurina A; la presenza in triplice copia di entrambi contribuisce a deficit di apprendimento e memoria, alterazione della plasticità sinaptica, anomalie dei cicli cellulari⁽⁹⁾.

DYRK1A rappresenta il principale regolatore dell'espressione del gene REST, fattore chiave della pluripotenza cellulare e della differenziazione neuronale (FIG. 2); pertanto la triplice copia di DYRK1A in Hsa21 altera la differenziazione delle cellule pluripotenti e staminali embrionali.⁽¹⁰⁾

La sovraespressione di DYRK1A si associa ad anomalie dello sviluppo neurocognitivo ed a deficit di apprendimento e di memoria solamente in alcuni modelli animali di trisomia 21, come Ts65Dn mice, ed in alcuni pazienti con DS^(11,12); questo suggerisce che il polimorfismo e la diversa espressione di altri geni influiscono sugli effetti della trisomia DYRK1A.

FIG. 1: Dualspecificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) favorisce la fosforilazione di numerose proteine, coinvolte in diversi processi biologici e responsabili delle principali caratteristiche fenotipiche di DS.

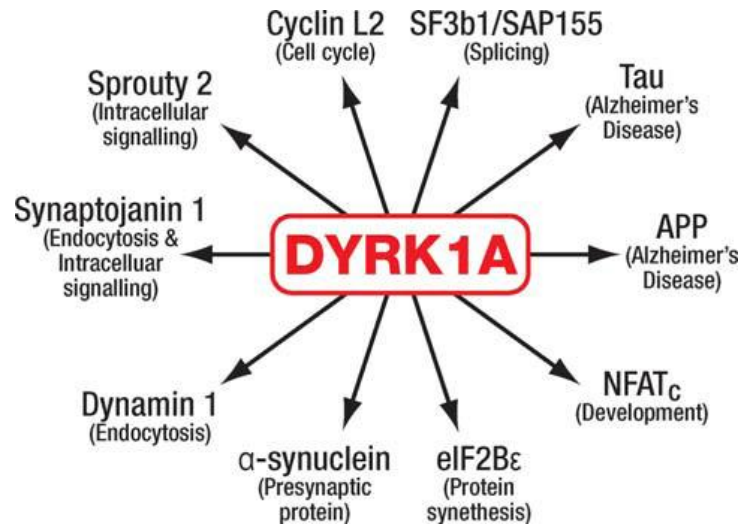
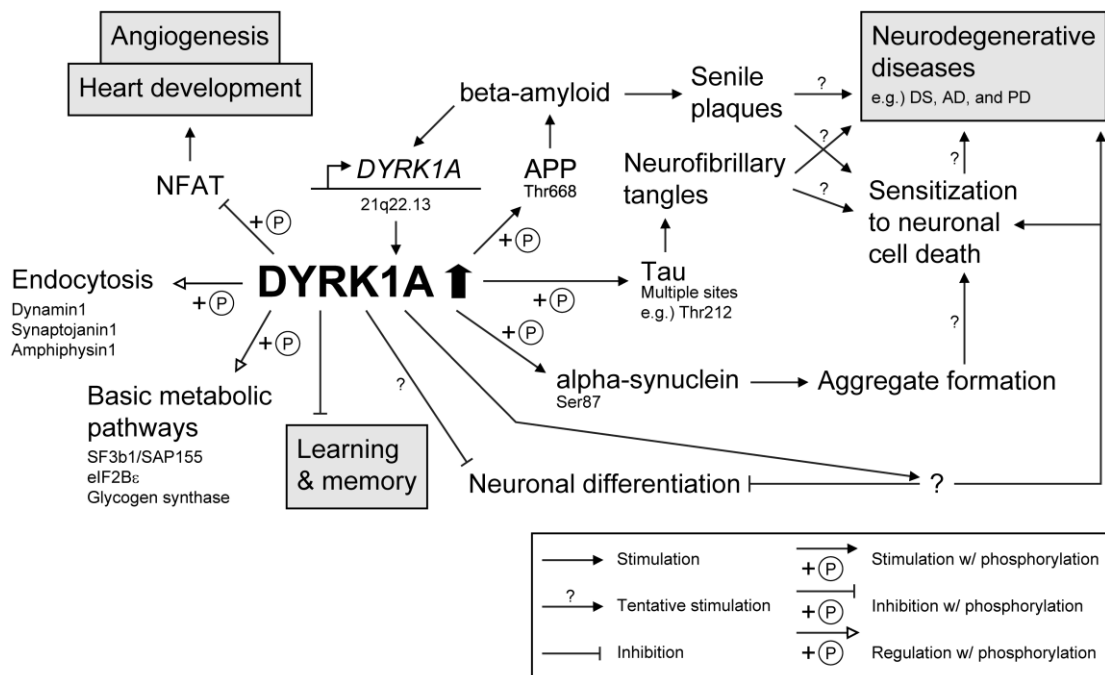


FIG. 2: Principali ruoli di DYRK1A nei vari processi cellulari e loro correlazione con i fenomeni neurodegenerativi che si realizzano nella Sindrome di Down.



2a La genetica delle cardiopatie congenite nella Sindrome di Down

Circa il 40-50% dei soggetti affetti da DS presenta una cardiopatia congenita, con notevole impatto sulla mortalità neonatale: canale atrioventricolare (39%), difetto interatriale tipo ostium secundum (42%), difetto interventricolare (43%), Tetralogia di Fallot (6%) ⁽¹³⁾.

I difetti cardiaci della DS sembrano associati prevalentemente a mutazioni a carico del gene non-Hsa21 CRELD1 ⁽¹⁴⁾. Si ritiene che la presenza in triplice copia di più di 100 geni Hsa21 possa alterare lo sviluppo del tessuto cardiaco, come è stato dimostrato nel modello murino di DS, Ts65Dn ⁽¹⁵⁾.

Sono necessari ulteriori studi per identificare i meccanismi citogenetici coinvolti nello sviluppo delle anomalie cardiache nei pazienti affetti da DS.

2b La genetica dei dismorfismi craniofaciali nella Sindrome di Down

Tutti i pazienti affetti da DS presentano dismorfismi craniofaciali più o meno evidenti, con espressività variabile in base alle diverse epoche di vita.

I principali dismorfismi craniofaciali caratteristici della DS sono determinati da anomalie dello sviluppo embrionale, secondarie a difetti di migrazione e proliferazione delle cellule della cresta neurale: nei modelli murini di trisomia 21, come Ts65Dn e Tc1, che manifesta le caratteristiche anomalie craniofaciali della DS ⁽¹⁶⁾, quali ipoplasia/dismorfismi mandibolari, sono stati riscontrati deficit numerico di cellule della cresta neurale ed un più piccolo primo arco faringeo ⁽¹⁷⁾.

2c La genetica dei disordini mieloproliferativi nella Sindrome di Down

La malattia mieloproliferativa transitoria è una neoplasia a regressione spontanea, specifica del soggetto con DS specie nell'epoca neonatale e nella prima infanzia.

Il fattore di trascrizione GATA1 è necessario per il normale sviluppo e la normale maturazione delle cellule della linea eritroide e dei megacariociti. Mutazioni a carico del fattore di trascrizione GATA1 sono state correlate con l'elevata incidenza di disordini mieloproliferativi transitori nei neonati con DS ⁽¹⁸⁾ e di leucemia acuta linfoblastica e megacarioblastica nel bambino con DS ⁽¹⁹⁾; la stessa trisomia di Hsa21 di per sé determina un'espansione sia delle cellule precursori della linea eritroide che dei megacariociti e rende queste stesse cellule più suscettibili alle mutazioni di GATA1 ⁽²⁰⁾.

3. LA SINDROME DI DOWN: ANOMALIE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE E DISABILITA'

La trisomia di Hsa21 rappresenta la principale causa di ritardo mentale e tutti i pazienti con DS presentano un grado moderato-severo di disabilità. In letteratura si riporta che l'8-13,6% dei soggetti con DS sviluppa epilessia, mentre l'incidenza di autismo è stimata intorno a 7-11%.

In generale, le tappe dello sviluppo seguono la normale sequenza, con un particolare deficit nella produzione di linguaggio; in età pediatrica si riscontrano disturbi comportamentali come il deficit di attenzione e iperattività (6,1% dei casi), il disturbo oppositivo della condotta (5,4%) o un comportamento aggressivo (6,5%) mentre possono occorrere in età adulta Depressione Maggiore (6,1%) o comportamento aggressivo (6,1%).

Nei soggetti affetti da DS, così come nel modello murino Ts65Dn, sono state riscontrate dimensioni cerebrali significativamente più ridotte ed un cervelletto sproporzionatamente più piccolo: si tratta essenzialmente di una riduzione del volume cerebrale, in particolare per ipoplasia di ippocampo, corteccia cerebrale e sostanza bianca, con una significativa riduzione del numero di cellule neuronali ^(21, 22). Queste

anomalie derivano fondamentalmente da alterazioni di sviluppo negli stadi iniziali della neurogenesi.

L'esame di feti affetti da DS (17°-21° settimane) ha evidenziato la presenza di un ridotto numero di cellule a livello del giro dentato, dell'ippocampo e del giro paraippocampale; nei feti con DS vi è una prevalenza di precursori degli astrociti rispetto a cellule con fenotipo neuronale; inoltre vi è una minor proliferazione cellulare e una maggior incidenza di apoptosi cellulare a livello della regione dell'ippocampo e nella zona germinativa dei ventricoli laterali ^(23, 24).

Studi condotti sul modello murino Ts65Dn hanno evidenziato che i precursori delle cellule neuronali, in presenza di trisomia 21, presentano una ridotta risposta mitogena con conseguente deficit cellulare ⁽²⁵⁾; infine, in diverse zone del cervello di feti affetti da DS, si è rilevato la presenza di alterazioni dei cicli cellulari che possono essere alla base di una ridotta potenzialità proliferativa ⁽²⁶⁾.

Oltre alle anomalie di sviluppo del sistema nervoso centrale sono state recentemente identificati diversi geni apoptosi-correlati (p53, fas, GAPDH, ecc) che hanno un ruolo fondamentale nella predisposizione della morte neuronale nel tessuto cerebrale di soggetti con DS attraverso un meccanismo di iperproduzione di specie reagenti dell'ossigeno ⁽²⁷⁾.

Le anomalie strutturali cerebrali, in associazione alla trisomia di vari geni, come DYRK1A, e di proteine canali neuronali, come GIRK2 (Gprotein-coupled inward-rectifying potassium channel subunit 2) ⁽²⁸⁾ potrebbero contribuire ai difetti di apprendimento e di memoria caratteristici della DS, come è stato dimostrato da diversi studi sui modelli murini.

I deficit di apprendimento e di memoria sono principalmente correlati ad anomalie del processo elettrofisiologico di "potenziamento a lungo termine", che si realizza nel giro dentato dell'ippocampo, ipoplasico nella DS ⁽²⁹⁾; si associano poi specifiche alterazioni

sinaptiche sempre a livello dell'ippocampo, così come una riduzione del numero stesso delle sinapsi^(30, 31, 32).

Le anomalie di sviluppo del sistema nervoso descritte contribuiscono al processo di degenerazione neuronale a cui vanno incontro precocemente e prematuramente i soggetti affetti da DS.

4. DEGENERAZIONE NEURONALE ED INVECCHIAMENTO PRECOCE NELLA SINDROME DI DOWN

La trisomia di Hsa21 comporta non solo un'elevata incidenza di ritardo mentale, ma anche un aumentato rischio di sviluppare demenza, con le manifestazioni neuropatologiche caratteristiche della malattia di Alzheimer (AD), e più precocemente rispetto al resto della popolazione; nei soggetti con DS appaiono più precoci in generale tutti i processi di invecchiamento^(33, 34).

Se da un lato si assiste ad un progressivo aumento dell'aspettativa di vita per la DS, dall'altro si evidenzia pure un corrispettivo incremento del rischio di sviluppare patologie neurologiche associate ad un invecchiamento precoce, in particolare demenza. L'aumentato rischio di insorgenza di demenza e soprattutto di AD è caratteristico della DS e non si riscontra nei soggetti affetti da altre differenti forme di disabilità.

Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi per comprendere i meccanismi alla base dei processi di degenerazione neuronale e di invecchiamento precoce ed accelerato che caratterizzano i pazienti affetti da DS e la correlazione tra AD e DS, con il principale scopo di introdurre nuove strategie terapeutiche.

5. LA SINDROME DI DOWN E LA MALATTIA DI ALZHEIMER: FATTORI DI RISCHIO E CORRELAZIONE NEUROBIOLOGICA

Come nella popolazione generale, così anche nella DS, i principali fattori di rischio per l'insorgenza di AD sono il progressivo invecchiamento, il comportamento depressivo, le patologie a carico della tiroide e i danni cerebrali; un altro importante fattore di rischio tipico della DS è la familiarità per demenza presenile così come l'epilessia.

Alcuni autori hanno riportato una maggior incidenza di nati affetti da DS nelle famiglie con storia familiare per AD ⁽³⁵⁾, altri invece hanno rilevato un aumentato rischio di comparsa di AD nelle madri che hanno avuto figli affetti da DS prima dei 35 anni di età⁽³⁶⁾.

Successivamente si è giunti alla conclusione che esiste, nella DSCR, un gene candidato per la familiarità per AD: questo gene codifica per il precursore della proteina amiloide (APP) ^(37, 38).

Si stima che le prime manifestazioni di AD compaiono a 30-40 anni di età e che, a partire dai 60 anni, il 50-70% dei pazienti con DS sviluppa demenza senile ⁽³⁹⁾; la maggioranza dei pazienti con DS, dopo i 30 anni, inizia a sviluppare modificazioni neuropatologiche cosiddette "Alzheimer-like": vengono interessate le stesse regioni cerebrali di AD, quali amigdala, ippocampo, aree della corteccia frontale, temporale e parietale, così come identiche sono le caratteristiche strutturali delle placche e le alterazioni a carico dei neurotrasmettitori ⁽⁴⁰⁾.

Diversi sembrano tuttavia i meccanismi patogenetici alla base della degenerazione neuronale nella DS rispetto ad AD: infatti le origini e l'evoluzione delle alterazioni morfologiche e biochimiche di AD nei soggetti affetti da DS sono da ricercare nelle fasi iniziali della vita; esiste pertanto una correlazione importante tra anomalie preesistenti

di sviluppo delle strutture dendritiche e della sinaptogenesi e degenerazione neuronale nella DS ⁽⁴¹⁾.

Vari studi hanno evidenziato che mutazioni a carico del gene SORL1 (sortilin-related receptor 1), regolatore della produzione della proteina precursore dell'amiloide (APP), aumentano il rischio di insorgenza precoce di AD nei soggetti con DS ⁽⁴²⁾: infatti, in presenza di trisomia 21, si realizza un incremento della produzione di APP e, di conseguenza, anche una aumentata formazione di beta amiloide (Abeta), sia di tipo A40 (Abeta40) che di tipo A42 (Abeta42); pertanto, già a partire dai 10 anni di vita, iniziano a depositarsi frammenti amiloidogenici a livello cerebrale con conseguente formazione di placche senili; il danno ossidativo ed i processi infiammatori a carico del tessuto nervoso accelerano questo processo, in particolare dopo i 40 anni.

Tuttavia il deposito di proteina amiloide è un fattore necessario, ma non sufficiente per la patogenesi di AD e nei pazienti con AD senza DS non sono stati rilevati elevati livelli di proteina amiloide come nei soggetti affetti da DS.

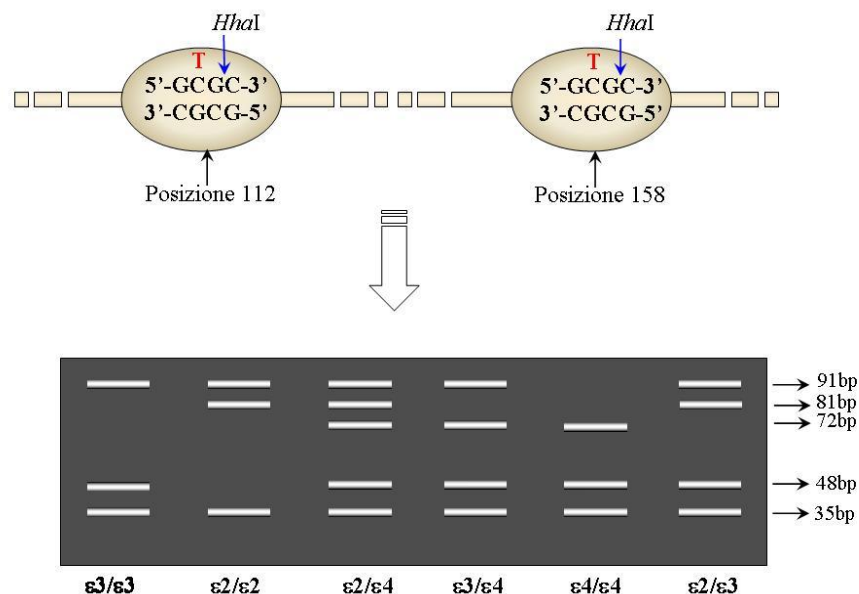
Nei pazienti con DS, la presenza di aumentati livelli di Abeta40 e Abeta42 è associata alla apolipoproteina E4 (ApoE4) ⁽⁴³⁾.

Il gene che codifica per ApoE è localizzato sul cromosoma 19 e ha 3 alleli, epsilon 2 ($\epsilon 2$), epsilon 3 ($\epsilon 3$) ed epsilon 4 ($\epsilon 4$), i quali codificano rispettivamente per 3 isoforme ApoE2, ApoE3, ApoE4 (FIG. 3). Diversi studi hanno evidenziato che $\epsilon 4$ costituisce un fattore di rischio per lo sviluppo di declino neurocognitivo e di demenza, in particolare di AD ⁽⁴⁴⁾. Inoltre la presenza di $\epsilon 4$, contrariamente agli altri aplotipi, correla con un più rapido declino neurocognitivo nei pazienti con DS che sviluppano un quadro AD-like: nei soggetti affetti da DS con genotipo ApoE4 si riscontra una correlazione inversamente proporzionale tra quoziente intellettivo totale (QIT) ed età ⁽⁴⁵⁾. Infine è

stato ipotizzata un'interazione tra ApoE4 e determinati aplogruppi di DNA mitocondriale (mtDNA) con conseguente suscettibilità allo sviluppo di AD ⁽⁴⁶⁾.

Le nuove tecniche di radiodiagnostica (MR, MRS, PET) hanno consentito di rilevare varie correlazioni tra le modifiche strutturali cerebrali nei pazienti affetti da DS che sviluppano demenza e quelle che si riscontrano nei malati di AD: i pazienti con DS presentano una significativa atrofia cerebrale solo quando hanno già sviluppato le manifestazioni cliniche di demenza; inoltre con il trascorrere degli anni sviluppano una progressiva dilatazione ventricolare ed ulteriore riduzione di dimensione dell'ippocampo, meno apprezzabili o non evidenti nei soggetti Down senza demenza ^(47, 48); sono state infine evidenziate alterazioni dei processi metabolici a livello delle membrane cellulari nel tessuto cerebrale con conseguente degenerazione e morte neuronale ⁽⁴⁹⁾.

FIGURA 3: Schema dei possibili genotipi relativi al polimorfismo triallelico del gene ApoE: ogni genotipo, fatta eccezione per il frammento da 35bp in comune, possiede una diversa combinazione di frammenti di HhaI; $\epsilon 2/\epsilon 2$ contiene frammenti da 91bp e 81 bp; $\epsilon 3/\epsilon 3$ contiene frammenti da 91bp e da 41bp; $\epsilon 4/\epsilon 4$ contiene frammenti da 48bp e 72bp.



6. CORRELAZIONE FRA DEFICIT IMMUNITARI ED INVECCHIAMENTO PRECOCE NELLA SINDROME DI DOWN

La demenza, in particolare AD, e la degenerazione neuronale non rappresentano le uniche espressioni di invecchiamento precoce nella DS; esistono infatti altre manifestazioni cliniche e markers biochimici indicativi di “early aging”; fra questi in particolare la produzione di autoanticorpi e lo sviluppo di patologie autoimmuni.

Alcuni autori hanno correlato la presenza di elevati livelli di autoanticorpi e la comparsa di malattie autoimmuni nei bambini, negli adolescenti e nei giovani adulti affetti da DS, con un precoce invecchiamento del sistema immunitario⁽⁵⁰⁾.

Ancora oggi non è chiaro se le alterazioni del sistema immunitario osservate nella trisomia 21 siano semplicemente la conseguenza di un difetto intrinseco funzionale delle cellule linfocitarie o siano espressione di early aging^(51, 52).

Infatti, nella DS, anche il sistema immunitario, così come il sistema nervoso, sembra andare incontro a precoce invecchiamento: i deficit immunitari caratteristici della DS sono espressione di un difetto intrinseco iniziale, durante lo sviluppo, in presenza di trisomia 21; questo deficit primario sarebbe responsabile di un processo di prematuro invecchiamento del sistema immunitario⁽⁵³⁾.

Nei pazienti con DS si osservano molteplici anomalie immunologiche, fra cui alterazioni delle sottopopolazioni cellulari linfocitarie, disfunzioni delle cellule del sistema immunitario, sviluppo di cellule tumorali e produzioni di autoanticorpi; si tratta di anomalie più frequentemente età-correlate e fanno appunto parte del quadro di “early aging”, caratteristico di DS⁽⁵⁴⁾.

Un'altra caratteristica dei soggetti con DS è rappresentata dalla progressiva espansione di cellule con originaria attività di natural killer non funzionali: ne consegue un deficit della stessa attività natural killer⁽⁵⁵⁾.

7. LO STRESS OSSIDATIVO, LE MUTAZIONI DEL DNA MITOCONDRIALE E L'INVECCHIAMENTO PRECOCE NELLA SINDROME DI DOWN

Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi relativamente a due principali eventi alla base dei fenomeni neurodegenerativi e del processo di invecchiamento precoce nella DS: lo stress ossidativo e le mutazioni del DNA mitocondriale (mtDNA).

E' noto che diverse patologie neuromuscolari degenerative sono associate a progressivo accumulo di danno ossidativo nel mtDNA del tessuto nervoso e numerose mutazioni di mtDNA stesso sono la causa di gravi malattie trasmesse per via materna. Oltre a mutazioni ereditarie, il mtDNA è soggetto ad un elevato tasso di mutazioni somatiche poiché è una molecola scarsamente protetta da proteine (al contrario del DNA nucleare che è protetto da molecole istoniche) ed inoltre si trova nelle immediate vicinanze dei siti di produzione dei radicali liberi dell'O₂.

Le cellule dei mammiferi possiedono da 100 a più di 1000 mitocondri, ciascuno dei quali può avere da 2 a più di 100 copie di mtDNA; mtDNA è una piccola molecola circolare di DNA di 16569 bp presente in molte copie all'interno di ciascun mitocondrio, è ereditato solo per via materna e rappresenta l'unico deposito di informazioni genetiche al di fuori del nucleo.

Il mtDNA codifica per 22 tRNA, 2 rRNA e 13 polipeptidi componenti essenziali dei complessi della catena respiratoria necessaria per la produzione di ATP; tale produzione è essenziale per tutto il metabolismo cellulare ed il mantenimento dell'organismo. La principale funzione dei mitocondri non è solamente produrre ATP attraverso la catena respiratoria, ma anche regolare la formazione e lo smaltimento di reagenti dell'ossigeno (ROS, reactive-oxygen-species) e quindi di radicali liberi dell'ossigeno. Il numero e la funzione dei mitocondri sono regolati da una serie di proteine codificate dal DNA mitocondriale e nucleare.

Lo stress o danno ossidativo è definito come uno sbilanciamento tra processi biochimici che portano alla produzione di ROS e quelli responsabili della loro rimozione, la cosiddetta “cascata cellulare antiossidante”: un evento di stress ossidativo si produce all’interno di una cellula quando si verifica uno squilibrio tra la produzione di radicali liberi e la capacità del sistema antiossidante di neutralizzarli.

Il danno ossidativo si accompagna generalmente a difetti della respirazione mitocondriale e della fosforilazione ossidativa.

E’ stato recentemente dimostrato che il difetto di riparazione del danno ossidativo di mtDNA ha un ruolo fondamentale nel processo di invecchiamento⁽⁵⁶⁾.

La “teoria mitocondriale” dell’invecchiamento, revisione della teoria dei radicali liberi”⁽⁵⁷⁾, sostiene che, con il passare del tempo, si realizza un progressivo accumulo di mutazioni a carico di mtDNA, con conseguente perdita di funzione e successiva morte accelerata delle cellule; il danno età-correlato degli enzimi della catena respiratoria comporta non solo una ridotta sintesi di ATP, ma anche un’aumentata produzione di ROS e di radicali liberi così che il mtDNA, non protetto da istoni e 10 volte più suscettibile a mutazioni rispetto al DNA nucleare, viene esposto al danno ossidativo. Con il trascorrere degli anni, in particolare già a partire dalla terza decade, le mutazioni a carico di mtDNA tendono sempre più ad aumentare così come risulta sempre più deficitaria sia la funzione bioenergetica sia l’efficienza trascrizionale dei mitocondri ed altrettanto compromessa sarà la capacità di riparazione del danno ossidativo⁽⁵⁸⁾.

Nell’invecchiamento si assiste ad un progressivo declino dell’attività e delle funzioni dei sistemi antiossidanti mitocondriali con conseguente accumulo di danno ossidativo tissutale.

La protezione delle strutture citoplasmatiche dal danno ossidativo avviene attraverso l’azione di tre sistemi enzimatici antiossidanti: la superossido dismutasi (SOD), la

catalasi (Cat) e la glutathione perossidasi (GPx); la cellula presenta un'omeostasi enzimatica in grado di neutralizzare la produzione di radicali liberi di origine esogena ed endogena, attraverso l'azione sinergica di SOD, Cat, GPx e della carbonil reduttasi (CBR): i principali enzimi antiossidanti danneggiati sono MnSOD (Mn²⁺-dependent superoxide dismutase), Cu/Zn SOD (copper/zinc superoxide dismutase), GPx (glutathione peroxidase), GR (glutathione reductase), and CAT (catalase)⁽⁵⁹⁾.

Le mutazioni di mtDNA sono più frequentemente delezioni a carico di geni che codificano per tRNAs e mRNAs, essenziali per le funzioni mitocondriali; alcuni geni di mtDNA risultano più esposti allo stress ossidativo e quindi più suscettibili alle delezioni; in generale mtDNA è 20 volte più esposto al danno ossidativo rispetto al DNA nucleare.

Il progressivo accumulo di ROS nell'invecchiamento determina non solo mutazioni di mtDNA, ma induce l'apoptosi cellulare attraverso le alterazioni mitocondriali conseguenti al danno ossidativo⁽⁶⁰⁾: la riduzione del numero di cellule attraverso l'apoptosi, in un tessuto/organo, ne determina la perdita di funzione: rimangono ancora da definire come vengano compromessi i processi enzimatici che regolano l'apoptosi cellulare.

Nell'invecchiamento, vi è quindi una stretta correlazione fra down-regulation dell'apoptosi cellulare e danno ossidativo/ mutazioni di mtDNA.

Per concludere si può affermare che il declino della funzione respiratoria, la produzione mitocondriale di ROS, lo stress ossidativo e la suscettibilità all'apoptosi cellulare, connessi fra loro, rappresentano gli eventi cruciali del processo di invecchiamento (FIG. 4).

Una sovraespressione di questi eventi, in presenza della trisomia di Hsa21, ed in particolare un'aumentato stress ossidativo costituirebbero la causa dell'invecchiamento

precoce ed accelerato nella DS⁽⁶¹⁾: i pazienti affetti da DS infatti presentano una precoce condizione di suscettibilità al danno ossidativo⁽⁶²⁾ e i principali markers di stress ossidativo sono già elevati nell'infanzia, in particolare è riportata una sovraespressione di superossido dismutasi (SOD) ⁽⁶³⁾, il cui gene mappa nella DSCR (21q22.11), e di GPx⁽⁶⁴⁾.

Nel processo di invecchiamento il danno ossidativo e le mutazioni di mtDNA si accumulano causando una progressiva perdita della funzione bioenergetica e dell'azione mitocondriale antiossidante.

Di conseguenza si realizza un declino funzionale dei tessuti ed apoptosi/necrosi cellulare.

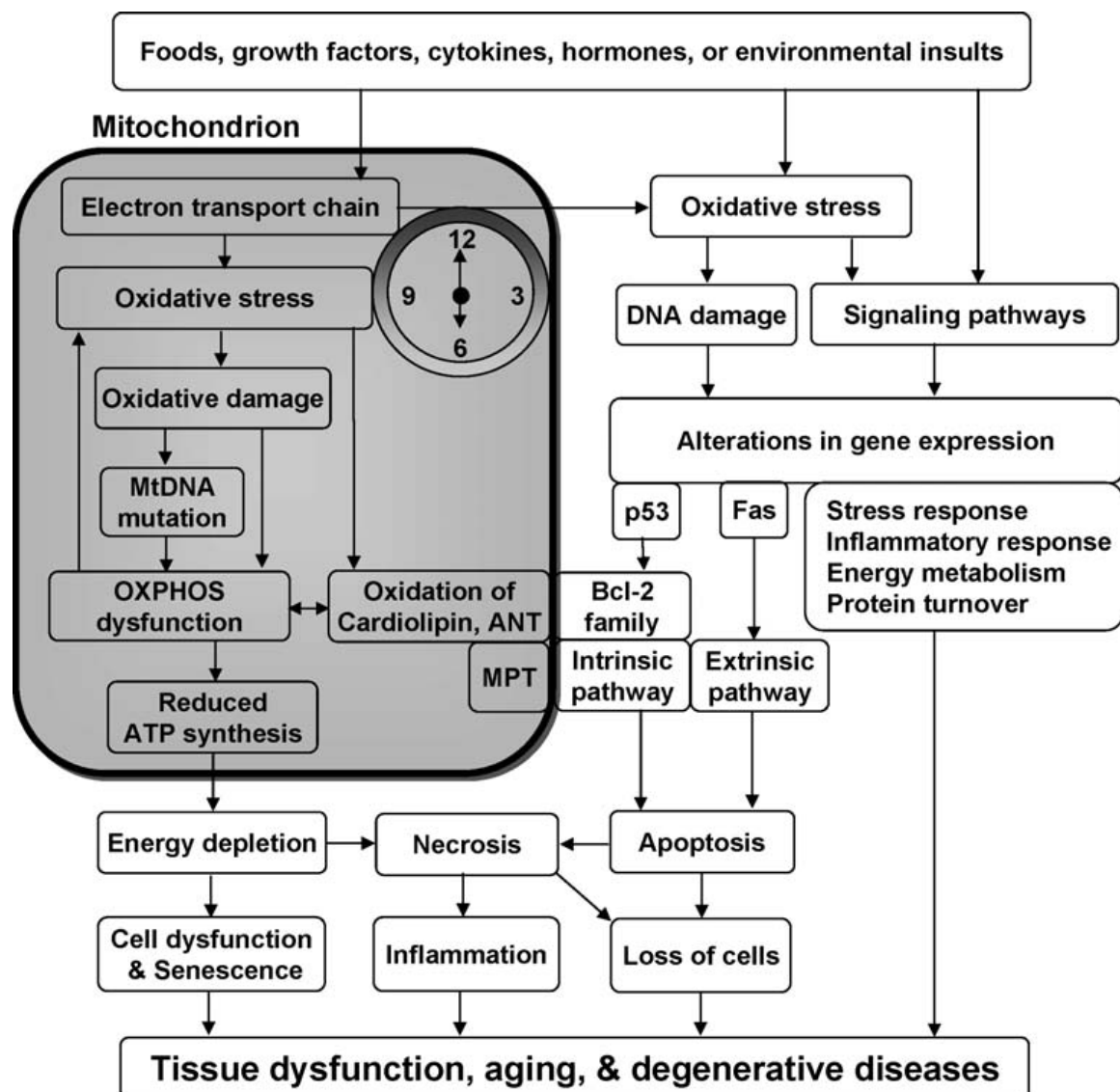
L'alimentazione, il sistema ormonale, i fattori di crescita e l'esposizione a danni esterni, influiscono sul metabolismo mitocondriale, sullo stress ossidativo e sull'espressione genica.

FIG. 4: RUOLO DEL MITOCONDRIO NEL PROCESSO DI INVECCHIAMENTO

Una parte dell'ossigeno della catena respiratoria non viene completamente ridotto e si generano ROS e radicali liberi dell'ossigeno, che generalmente vengono smaltiti dalla funzione coordinata dei sistemi enzimatici antiossidanti.

Se questo meccanismo fallisce i ROS possono causare danno ossidativo e mutazioni di mtDNA.

Ne consegue un'alterazione dei processi di trascrizione delle proteine codificate con ridotta efficienza nella sintesi di ATP ed ulteriore produzione di ROS.



8. ALTERAZIONI DEL METABOLISMO DELL'OMOCISTEINA ED IPERURICEMIA NELLA SINDROME DI DOWN: CORRELAZIONE CON LO STRESS OSSIDATIVO.

L'omocisteina (tHcy) è un prodotto del metabolismo della metionina, aminoacido essenziale introdotto con la dieta.

Normalmente il metabolismo di tHcy comprende 2 vie principali ⁽⁶⁵⁾: 1) *via della remetilazione*, in cui sono coinvolti gli enzimi metionina-sintasi, metilenetetraidrofolatoreduttasi (MTHFR), betaina-sintasi, con metionina come catabolita finale; 2) *via della transulfurazione*, che sfrutta l'enzima cistationina-b-sintasi (CBS) e produce la cisteina.

Nella via della remetilazione, tHcy può essere remetilato a metionina mediante due processi; nel primo, “ciclo dei folati”, in cui è fondamentale la presenza dell'acido folico, MTHFR riduce il 5,10-metilene-tetraidrofolato a 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF); quest'ultimo fornirà poi, in presenza della vitamina B12, il gruppo metilico necessario per la riconversione di tHcy in metionina; nel secondo processo, la reazione di remetilazione è svolta dall'enzima betaina-sintasi che produce metionina catalizzando il trasferimento di un gruppo metilico dalla betaina a tHcy.

Nella via metabolica della transulfurazione invece CBS, coadiuvato dalla vitamina B6, catalizza la reazione di condensazione tra omocisteina e serina con formazione di cistationina che successivamente viene degradata a cisteina.

Pertanto diverse vitamine del gruppo B, l'Acido Folico (vitamina B9), la Betaina (Trimetilglicina), la Cianocobalamina (vitamina B12), la Piridossina (vitamina B6) influenzano il metabolismo di tHcy e risultano essenziali per la riduzione dei livelli plasmatici di questo amminoacido.

Da alcuni anni è noto che un aumento dei livelli plasmatici di omocisteina, senza alcuna differenza di sesso, costituisce un importante fattore di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari, cerebrovascolari e vascolari periferiche ^(66, 67, 68). E' emerso inoltre che l'iperomocisteinemia è un fattore di rischio per lo sviluppo della demenza e della malattia di Alzheimer ⁽⁶⁹⁾.

I soggetti affetti da DS presentano livelli di tHcy ridotti ⁽⁷⁰⁾; infatti il gene che codifica per CBS è stato mappato sul cromosoma 21 ed in presenza di trisomia di Hsa21 viene sovraespresso; attraverso un'iperattivazione della transulfurazione, si determina una riduzione dei livelli plasmatici di tHcy; questo indirettamente determina da un lato una riduzione dell'attività della metionina-sintasi, dall'altro un accumulo di 5-MTHF.

La ridotta attività della metionina-sintasi comporta una ridotta conversione di 5-MTHF in tetraidrofolato (THF), che rappresenta la forma metabolicamente attiva del folato, fondamentale per la produzione di nucleotidi per la sintesi di RNA e DNA: nei pazienti affetti da DS, pertanto si può avere un deficit funzionale di folati, pur in presenza di livelli plasmatici normali.

Esistono tuttavia dei polimorfismi del gene che codifica per la metionina sintasi (MTR), associati ad iperomocisteinuria (tHcy > 15 micromol/L) nei soggetti con DS ⁽⁷¹⁾.

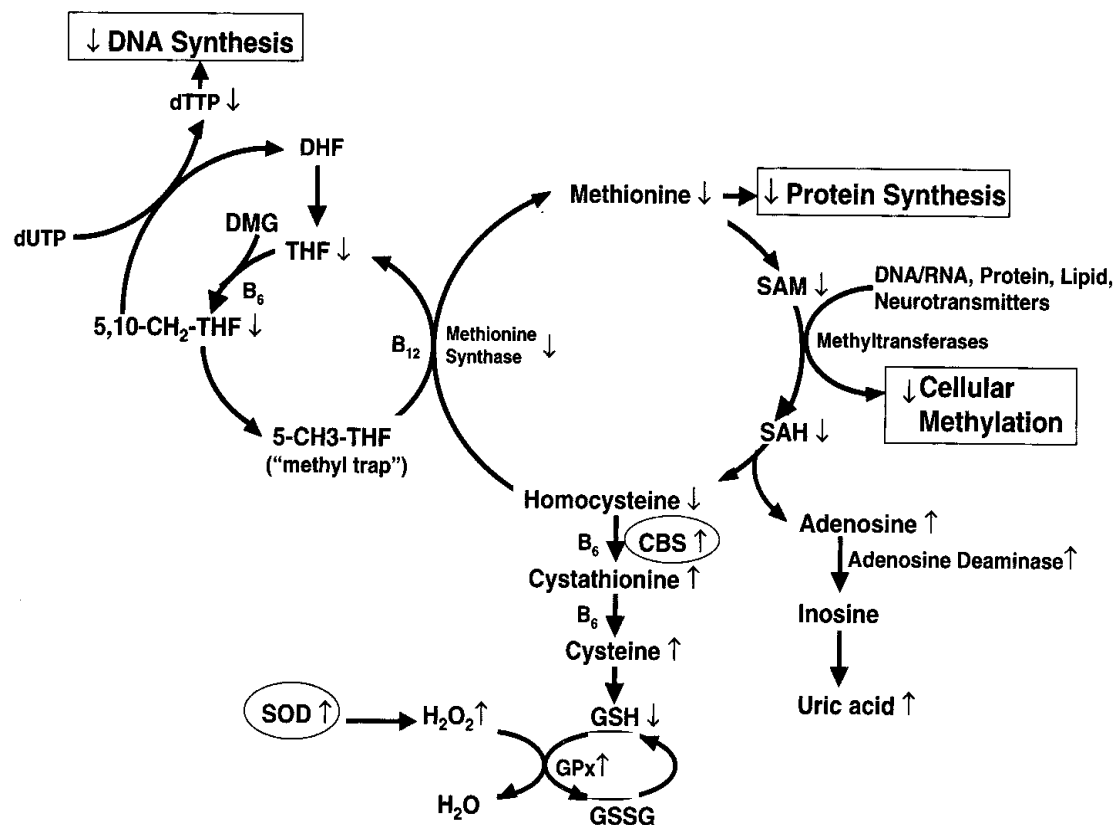
Le alterazioni del metabolismo di tHcy, in presenza di trisomia 21, sono strettamente correlate con lo stress ossidativo e, si ritiene, siano la causa principale dell'iperuricemia caratteristica dei soggetti con DS nei quali si riscontrano anche aumentati livelli plasmatici di adenosina, precursore dell'acido urico, ed iperattività dell'adenosina deaminasi; secondo alcuni autori l'iperuricemia in presenza di trisomia 21 è causata da un'eccessiva produzione di purina secondariamente a sovraespressione del gene GARS-AIRS-GART, presente in Hsa21 ⁽⁷²⁾; recentemente si sostiene invece che la

sovraespressione di CBS, attraverso una iperproduzione di adenosina, sia la principale causa di iperuricemia nella DS.

Infine l'aumento dei livelli di acido urico e del suo corrispettivo prodotto ossidativo, l'allantoina, nei soggetti affetti da DS, è correlato ad un incrementato danno ossidativo⁽⁷³⁾. Nella FIG. 5 sono descritte le alterazioni dei processi metabolici di tHcy nella DS.

FIGURA 5: La sintesi e la riparazione del DNA da un lato e la metilazione cellulare dall'altro sono 2 processi metabolici che si intersecano con la sintesi della metionina, vitB12/folati dipendente: la metionina viene prodotta a partire dalla omocisteina e, contemporaneamente, si produce tetraidrofolato indispensabile per la sintesi di DNA/RNA.

Nella sindrome di Down, i due geni CBS e SOD, presenti entrambi sul cromosoma 21, risultano sovraespressi con conseguenti alterazioni dirette ed indirette dei processi metabolici in cui sono coinvolti.



OGGETTO DI STUDIO

1. SINDROME DI DOWN E FATTORI DI RISCHIO NEL DECLINO NEUROCOGNITIVO

A partire dal 2007, presso il Centro dello Studio delle Malformazioni Congenite dell'Unità Operativa di Neonatologia, in collaborazione con il Centro per le Disabilità linguistiche e cognitive (AUSL, Bologna) e con il Dipartimento di Patologia Sperimentale, C.I.G. (Centro Interdipartimentale "L. Galvani") per Studi Integrati di Bioinformatica, Biofisica e Biocomplessità dell'Università di Bologna, è stato intrapreso uno studio con lo scopo di identificare, in una determinata popolazione di maschi e femmine in età adolescenziale/giovane-adulta, affetti da Sindrome di Down, parametri biologici e fattori genetici, correlati con il quadro clinico e neuropsicologico/neuropsichiatrico, predittivi di precoce invecchiamento e decadimento neurocognitivo.

L'identificazione di determinati parametri metabolici biomarcatori di degenerazione neuronale costituisce la base di partenza per attuare appropriati interventi terapeutici mirati.

2. MATERIALI E METODI

Nello studio sono stati arruolati 50 pazienti affetti da DS (diagnosi confermata da cariotipo), 26 maschi e 24 femmine (SEX RATIO: M/F = 1,08); i soggetti sono stati suddivisi in 3 fasce d'età: la fascia d'età di 1-18 aa, che comprende 13 pazienti (7 F e 6 M); la fascia d'età di 19-30aa, che comprende 20 pazienti (10 F e 10 M); la fascia d'età > 30 aa, che comprende 17 pazienti (7 F e 10 M).

Sono stati, inoltre, inclusi la madre di ciascun paziente DS e, quando possibile, un fratello/una sorella di età/sesso comparabile, come caso controllo.

Sono stati esclusi pazienti con patologie acute in atto, pazienti con insufficienza epatica, renale o cardiaca, pazienti affetti da specifica malattia mitocondriale associata (situazione estremamente rara), pazienti che abbiano assunto negli ultimi due mesi polivitaminici o altre sostanze antiossidanti.

Per ciascun paziente, previo consenso informato e mediante l'utilizzo di appropriate schede (Tavola 1: scheda compilativa), con relativa parte riservata anche alla madre e al fratello, sono stati raccolti i seguenti dati:

- anamnesi patologica recente e remota, con particolare attenzione alla presenza delle malattie più comunemente riscontrate nella DS e relativi percorsi terapeutici.
- anamnesi socio-economica, con riferimento in particolare all'integrazione sociale e lavorativa del paziente affetto da DS e ai percorsi assistenziali sul territorio.
- parametri auxologici, più specificatamente peso (P), altezza (H), circonferenza cranica (CC), circonferenza addominale (CA), indice di massa corporea (BMI) e relativi percentili.
- esame neurologico, valutazione neuropsicologica e neuropsichiatrica, valutazione dello stato cognitivo e del linguaggio, in rapporto alle diverse età, mediante l'utilizzo di scale e test specifici (Tavola 2) e l'attribuzione di un determinato punteggio relativo alle diverse prove previste dai test stessi; prove di lateralità ⁽⁷⁴⁾.
- compilazione del questionario DSQIID (DEMENTIA SCREENING QUESTIONNAIRE FOR INDIVIDUALS WITH INTELLECTUAL DISABILITIES) ⁽⁷⁵⁾ per l'identificazione di fattori predittivi di demenza (Tavola 3), che prevede l'assegnazione di un punteggio per ogni singola domanda: un punteggio complessivo di 20 è indicativo di demenza.

Ogni paziente è stato sottoposto a prelievo ematico (10-12 cc di sangue) per valutare non solo i principali parametri biochimici, comunemente misurati nell'ambito del

follow-up della DS, ma anche specifici biomarcatori della capacità antiossidante e dei livelli di stress ossidativo: emocromo completo con formula; VES; fibrinogeno, PT e PTT; elettroliti sierici; funzionalità renale (urea, creatinina); glucosio, fruttosamina e Hb glicata; funzionalità epatica (GOT, GPT, γ GT, bilirubinemia); assetto marziale (ferro, ferritinemia, transferrinemia), colesterolemia e trigliceridemia; protidemia totale ed albuminemia; doaggio delle immunoglobuline (IgG, IgM, IgA); studio delle sottopopolazioni linfocitarie; funzionalità tiroidea (TSH, FT3, FT4, Ab antiTg, Ab antiTPO); anticorpi antitransglutaminasi (IgA e IgG antiTTG); vitamina B12 e folati; zinchemia; uricemia; ammoniemia; omocisteina (tHcy) .

Parte del campione ematico di ciascun paziente è stato utilizzato per la genotipizzazione di ApoE.

Ciascun fratello è stato sottoposto a prelievo ematico per le seguenti indagini: emocromo completo con formula; VES; fibrinogeno, PT e PTT; funzionalità renale (urea, creatinina); vitamina B12 e folati; zinchemia; uricemia; ammoniemia; omocisteina.

La genotipizzazione di ApoE è stata effettuata anche sui fratelli e nelle madri.

TAVOLA 1: SCHEDA COMPILATIVA

<i>Scheda della madre</i>	
Data prelievo	
Cognome Nome	
Indirizzo	
Telefono	
Luogo di nascita	Data di nascita
Regione d'origine	
Età	
Lavoro	
Scolarità	
Anamnesi familiare	
Patologie pregresse	
Patologie in corso	

<i>Scheda fratello/sorella</i>
Data prelievo
Cognome Nome
Indirizzo
Telefono
Data di nascita
Età
Lavoro
Scolarità
Patologie pregresse
Patologie in corso

<i>Scheda paziente</i>
Data visita
Cognome Nome
Indirizzo
Telefono
Data di nascita
Sesso
Età
CARIOTIPO
Composizione nucleo familiare
Anamnesi familiare
Gravidanza
Parto (segnalare se sofferenza/ittero)
Allattamento

Sviluppo motorio
Sviluppo linguaggio
Ipersensibilità rumori forti (o altra alterata sensibilità)
Controllo sfinteri, alvo e diuresi
<p>Ritmo sonno veglia, disturbi del sonno, russamento</p> <p>Sonno: frequenti risvegli, incubi notturni, frequenti cambiamenti di posizione nel sonno</p> <p>Mattino: difficoltà ad ingranare, mal di testa</p> <p>Durante il giorno. Irritabilità, sonnellini, difficoltà di concentrazione a scuola o nel lavoro</p>
Alimentazione (domandare anche assunzione vino)

Patologie pregresse
Patologie in corso
Diagnosi epilessia
Terapia farmacologica
Dosaggio
Tempo in mesi di inizio terapia farmacologica
Frequenza crisi

Altre terapie farmacologiche
Lesione cerebrale (RMN, TAC)
EEG
Altri esami strumentali
Trattamento riabilitativo
Inizio trattamento riabilitativo
Risposta al trattamento riabilitativo

Scolarità
Frequenza centro diurno
Attività fisica
Lavoro
Dove vive (famiglia, comunità, istituto)
Abitudini di vita: (es televisione, uscita con gli amici.....)
Fumo
Aspetti del comportamento, stereotipie, tono dell'umore, autostima.....

<i>Esame obiettivo neurologico</i>	
Data visita	
Cognome Nome	Data di nascita
Peso	Altezza
Circonferenza vita	Circonferenza anche
Circonferenza cranica	
Cute	
Nervi cranici	
Occhi posizione primaria	

Nistagmo
Tono muscolare
Forza muscolare
Riflessi superficiali
Riflessi profondi
Mingazzini arti superiori
Prova indice naso
Prova indice indice
Diadococinesi
Mingazzini arti inferiori

Prova calcagno ginocchio
Stazione eretta – Romberg
Marcia
Marcia tandem
Marcia punte
Marcia talloni
Altro

TAVOLA 2: Scale di valutazione dello stato cognitivo, del linguaggio, neuropsicologiche e neuropsichiatriche

VALUTAZIONE COGNITIVA
<p>Bayley Scales of Mental Development</p> <p>Griffiths Mental Development Scales (0-2 anni)</p> <p>Scale Ordinali di Uzigiris e Hunt 0-2 anni</p> <p>Scala WPPSI WPPSI - Scala d'intelligenza Wechsler a Livello Prescolare e di Scuola Elementare per soggetti di età dai 3 anni 10 mesi ai 6 anni e 7 mesi</p> <p>Scala WISC-R WISC-R - Scala d'Intelligenza Wechsler per Bambini Revisionata per soggetti tra i 6 anni e i 16 anni</p> <p>Scala WAIS-R WAIS-R - Scala d'Intelligenza Wechsler per adulti Revisionata per soggetti di età superiore ai 17 anni</p> <p>Matrici Progressive di Raven dai 5 anni</p> <p>scala LEITER-R (2 -20 anni)</p>
TEST PER LO STUDIO DELL'INVOLUZIONE E DEMENZA
<p>Dementia Scale for Down's Syndrome (DSDS) (Gedye, 1995)</p> <p>MODA (Milan Overall Dementia Assessment)</p> <p>MMSE (Mini Mental State Examination)</p>
VALUTAZIONE NEUROPSICOLOGICA
<p>Attenzione e concentrazione</p> <p>TEST DI SPAN (Digit, Block Tapping Test di P. Corsi)</p> <p>TEST DI CANCELLAZIONE (Mesulam, Zazzo)</p> <p>ATTENZIONE DISTRIBUITA (cifrario Wechsler)</p> <p>Memoria e apprendimento</p> <p>REY (Figure complesse A e B)</p> <p>VRT BENTON (Visual Retention Test)</p> <p>Visuospatialità e prassie</p> <p>BLOCK DESIGN (Costruzione di cubi, subtest Wechsler)</p> <p>VMGT BENDER (Visual Motor Gestalt Test)</p> <p>VOSP</p>
VALUTAZIONE DEL LINGUAGGIO
<p>prove di Rustioni per la comprensione morfosintattica dai 3 ai 7 anni</p> <p>test Peabody per la comprensione lessicale dai 3 anni e 9 mesi agli 11 anni e 6 mesi</p> <p>Token Test per esaminare la comprensione delle caratteristiche sintattiche e preposizionali del linguaggio ricettivo per tutti</p> <p>Test di denominazione di Sartori per valutare la capacità di denominazione</p> <p>FAS (Fluenza Verbale) e VOCABOLARIO (Subtest Wechsler)</p>
VALUTAZIONE NEUROPSICHIATRICA
<p>Childhood Autism Rating Scale (CARS)</p> <p>Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS)</p> <p>Autism Diagnostic Interview - Revised (ADI-R)</p> <p>Autism Behavior Checklist (ABC)</p> <p>Vineland - Adaptive Behavior Scales (VABS)</p>

Tavola 3

DATA SUPPLEMENT: DEMENTIA SCREENING QUESTIONNAIRE FOR INDIVIDUALS WITH INTELLECTUAL DISABILITIES (DSQIID)

DATA SUPPLEMENT TO BRITISH JOURNAL OF PSYCHIATRY (2007), 190, 440-444

3. RISULTATI

3.1 PARAMETRI BIOCHIMICI

I) AUMENTO DEI LIVELLI DI ANTICORPI ANTITIREOGLOBULINA (Ab antiTg) e ANTITIREOTROPINA (Ab antiTPO)

Il campione in esame comprende 20 pazienti, 11 M e 9 F, già in trattamento farmacologico con levotiroxina; un altro paziente ha iniziato la terapia dopo il controllo ematochimico.

Dei 50 pazienti studiati, 20 (40%), 13 F e 7 M, di cui 14 già in trattamento farmacologico sostitutivo, presentano un aumento dei livelli di anticorpi antitiroidei: in 3 femmine si è rilevato un aumento dei soli Ab antiTg, in 7 soggetti (4 F e 3 M) un aumento dei soli Ab antiTPO, in 10 soggetti (6 F e 4 M) un aumento di entrambi gli autoanticorpi (Grafico 1); in 6 soggetti (5 M e 1 F) i titoli anticorpali sono risultati nei limiti della norma, in corso tuttavia di trattamento farmacologico con levotiroxina.

Per quanto riguarda la suddivisione dei pazienti con elevati livelli di anticorpi antitiroidei nelle 3 fasce d'età considerate (Grafico 2), si rileva un aumento del titolo anticorpale in 6 (5 F e 1 M) dei 13 pazienti fra 1-18 anni d'età (46%), in 7 (4 F e 3 M) su 20 pazienti fra 19-30 anni (35%), in 7 (4 F e 3 M) su 17 pazienti con età > 30 anni (41%).

GRAFICO 1: DISTRIBUZIONE DEI LIVELLI AUMENTATI DI Ab antiTg E DI Ab antiTPO IN BASE AL SESSO DEI PAZIENTI

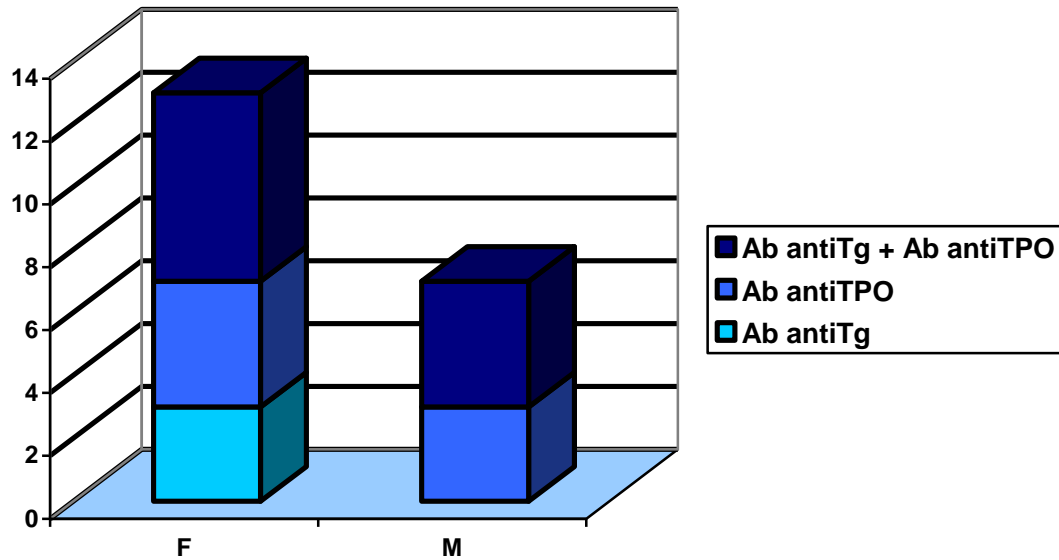
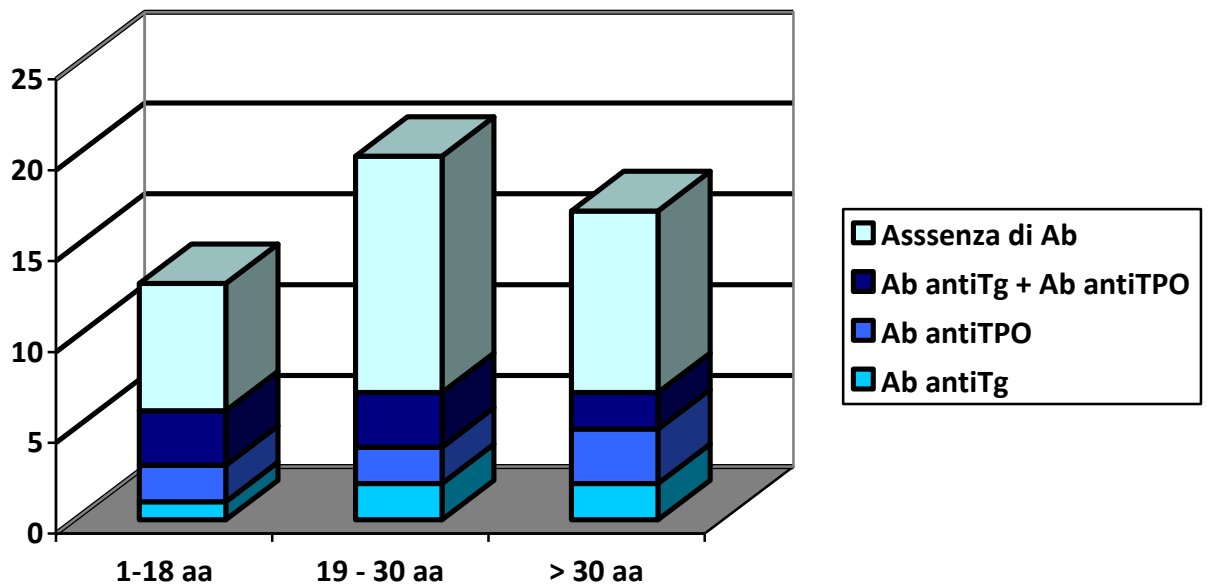


GRAFICO 2: DISTRIBUZIONE DEI LIVELLI AUMENTATI DI Ab antiTg E DI Ab antiTPO NELLE FASCE D'ETA' DEI PAZIENTI



II) AUMENTO DEI LIVELLI DI OMOCISTEINA

Relativamente al dosaggio di tHcy (valori di riferimento: 5-10 $\mu\text{mol/L}$), 26/50 pazienti (52%) presentano livelli normali; 20 soggetti (40%), 13 M e 7 F, presentano livelli superiori a 10 $\mu\text{mol/L}$ ed, in particolare, 9 tra 10 e 13 $\mu\text{mol/L}$ e 11 tra 13 e 60 $\mu\text{mol/L}$; bassi livelli di tHcy sono stati rilevati solamente in 4 pazienti (8%), tutte femmine (Grafico 3).

La metà dei pazienti con livelli di tHcy aumentati (6 M e 4 F) rientra nella fascia d'età 19-30 aa (Grafico 4).

Dei 20 soggetti con aumento di tHcy, 15 (75%) presentano una normale funzionalità tiroidea; mentre tutti e 4 i soggetti con livelli di tHcy diminuiti presentano aumento degli Ab antiTPO e degli Ab antiTG (Grafico 5).

Confrontando i livelli di tHcy nei nostri pazienti con quelli riscontrati nei fratelli, quando presenti, si può rilevare che, su 20 soggetti DS con tHcy aumentata, 6 (30%), 4 M e 2 F hanno un fratello/una sorella con corrispettivi livelli di tHcy elevati.

GRAFICO 3: DISTRIBUZIONE DEI LIVELLI DI tHcy NEI PAZIENTI IN BASE AL SESSO

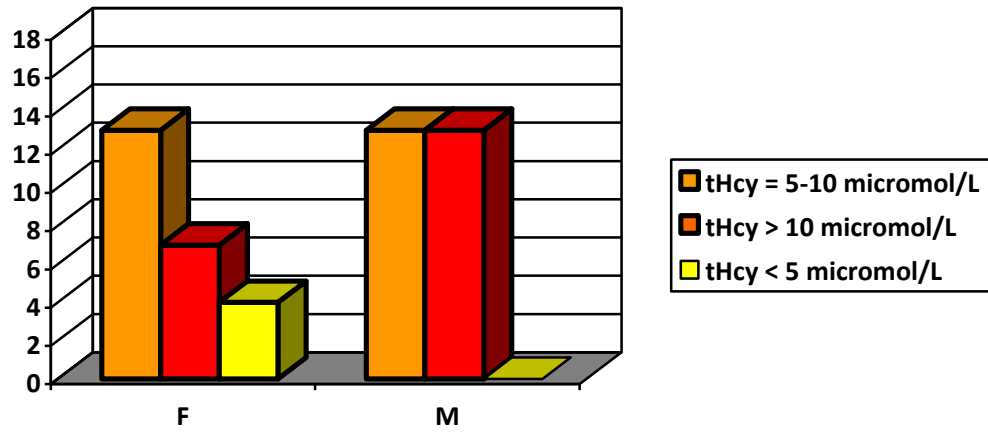


GRAFICO 4: DISTRIBUZIONE DEI LIVELLI DI tHcy NEI PAZIENTI IN BASE ALLE FASCE D'ETÀ

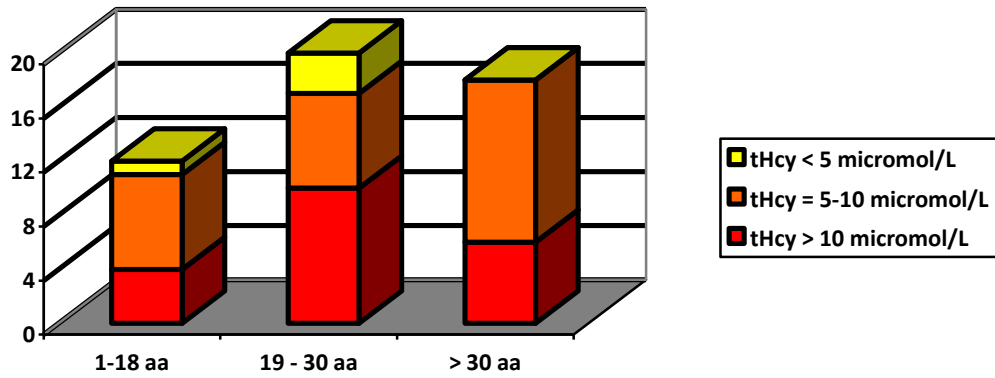
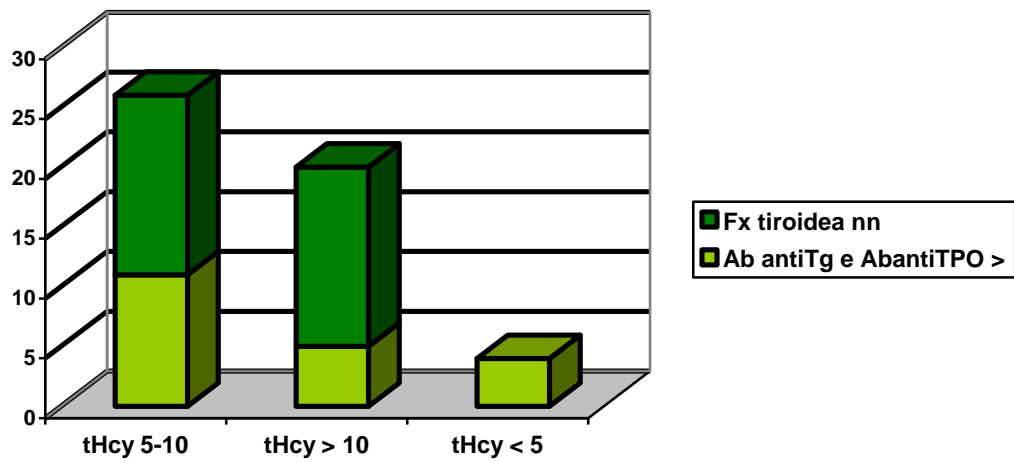


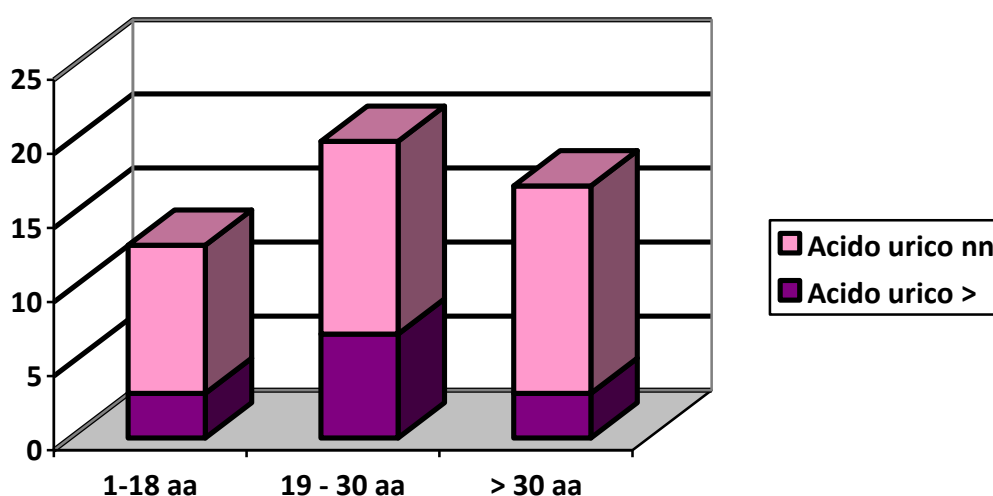
GRAFICO 5: CORRELAZIONE FRA LIVELLI DI tHcy E LIVELLI DI Ab antiTg e Ab antiTPO



III) IPERURICEMIA

Dei 50 pazienti arruolati, 13 (26%), 10 M e 3 F, hanno manifestato un incremento dei livelli di acido urico (> 7 mg/dl): 3 nella fascia d'età 1-18 aa, 7 nella fascia d'età 19-30 aa, 3 nella fascia d'età > 30 aa (Grafico 6).

GRAFICO 6: DISTRIBUZIONE DEI LIVELLI DI ACIDO URICO NEI PAZIENTI IN BASE ALLE FASCE D'ETÀ



IV) Per quanto riguarda la presenza di deficit a carico del sistema immunitario, nessuno dei pazienti studiati presenta alterazioni significative dei livelli di immunoglobuline e delle sottopopolazioni linfocitarie, in confronto con i valori di riferimento per età nella popolazione generale e, in particolare, in rapporto ai valori riscontrati nei fratelli.

Nessun paziente, inoltre, presenta positività degli anticorpi antitransglutaminasi (antiTTG), principali indicatori biochimici di malattia celiachia, che rientra nei disordini del sistema immunitario più frequenti della DS; così come non si rilevano modificazioni dei principali parametri biochimici indicatori di diabete mellito (glicemia, fruttosamina, Hb glicata, Anticorpi antiInsulina), altra patologia autoimmune ad alta incidenza nei soggetti con DS.

Infine non si segnalano alterazioni significative dei restanti parametri valutati.

3.2 VALUTAZIONI NEUROCOGNITIVE, PSICOLOGICHE, PSICHIATRICHE

I) Sulla base delle valutazioni neurocognitive effettuate, relativamente al quoziente intellettivo totale (QIT), si riscontra che, su 50 pazienti, 10 (20%) presentano RM lieve (QIT = 55-70), 23 (46%) presentano RM medio (QIT= 45-55), 5 (10%) presentano RM grave (QIT= 35-45), 12 (24%) presentano RM molto grave (QIT < 35) - (Grafico 7).

Su un totale di 26 maschi, 4 presentano RM lieve, 13 RM medio, 4 RM grave e 5 RM molto grave; su un totale di 24 femmine, 6 presentano RM lieve, 10 RM medio, 1 RM grave e 7 molto grave (Grafico 8).

In base alle diverse fasce d'età (Grafico 9), si rileva che:

- su 13 pazienti nella fascia d'età 1-18aa, 1 femmina presenta RM lieve, 5 (3 M e 2 F) RM medio, 2 (1 M e 1 F) RM grave, 5 (3 F e 2 M) RM molto grave.
- su 20 pazienti nella fascia d'età 19-30 aa, 6 (4 F e 2 M) presentano RM lieve, 11 (6 M e 5 F) RM medio, 2 maschi RM grave, 1 femmina RM molto grave
- su 17 pazienti nella fascia d'età > 30 aa, 3 (2 M e 1 F) presentano RM lieve, 7 (4 M e 3 F) RM medio, 1 maschio RM grave, 6 (3 M e 3 F) RM molto grave.

GRAFICO 7: INCIDENZA DI RITARDO MENTALE NEI PAZIENTI

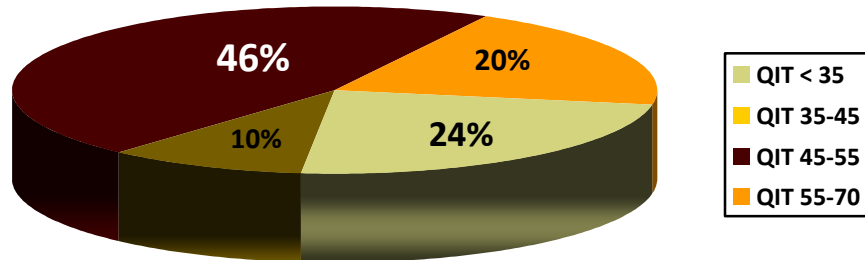


GRAFICO 8: DISTRIBUZIONE DEL QIT NEI PAZIENTI IN BASE AL SESSO

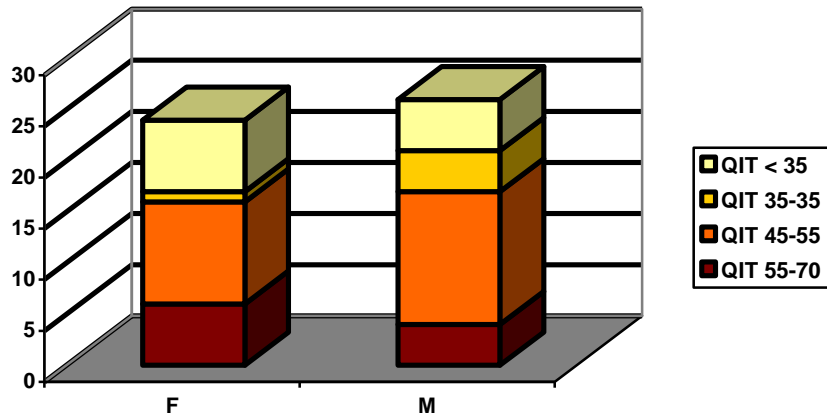
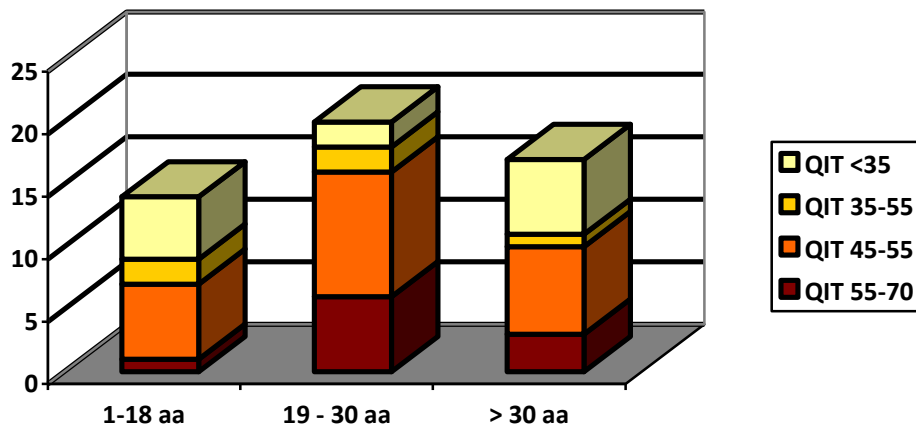


GRAFICO 9: DISTRIBUZIONE DEL QIT NELLE 3 FASCE D'ETA'



II) Per quanto riguarda la valutazione del quoziente intellettivo verbale (QIV) si riscontra che la maggioranza dei pazienti presenta un QIV lievemente e moderatamente basso (Grafico 10); infatti su 50 pazienti, 19 (38%), 10 M e 9 F, presentano QIV lievemente basso (55-70), 17 (34%), 10 M e 7 F, QIV moderatamente basso (45-55), 5 (10%), 4 F e 1 M, QIV molto basso (35-45) e 9 (18%), 5 M e 4 F, QIV estremamente basso (< 35).

Su 13 pazienti nella fascia d'età 1-18aa, 3 (2 M e 1 F) presentano QIV lievemente basso, 3 (2 F e 1 M) QIV mediamente basso, 5 (4 F e 1 M) QIV molto basso, 2 maschi QIV estremamente basso; su 20 pazienti nella fascia d'età 19-30 aa, 12 (7 F e 5 M) presentano QIV lievemente basso, 7 (5 M e 2 F) QIV moderatamente basso, 1 femmina QIV estremamente basso; su 17 pazienti nella fascia d'età > 30 aa, 4 (3 M e 1 F) presentano QIV lievemente basso, 7 (4 M e 3 F) QIV moderatamente basso, 6 (3 M e 3 F) QIV estremamente basso (Grafico 11).

III) La valutazione della performance (QIP) evidenzia che la maggioranza dei nostri pazienti presenta QIP tra 45-55 (Grafico 12); infatti 15 soggetti (30%), 8 F e 7 M, presentano QIP lievemente basso (55-70), 20 (40%), 13 M e 7 F, QIP moderatamente basso (45-55), 5 (10%), 4 F e 1 M, QIP molto basso (35-45), 10 (20%), 5 M e 5 F, QIP estremamente basso (< 35).

Su 13 pazienti nella fascia d'età 1-18aa, 1 femmina presenta QIP lievemente basso, 4 soggetti (3 M e 1 F) QIP moderatamente basso, 5 (4 F e 1 M) QIP molto basso, 3 (2 M e 1 F) QIP estremamente basso; su 20 pazienti nella fascia d'età 19-30 aa, 6 (3 M e 3 F) presentano QIP lievemente basso, 13 (7 M e 6 F) QIP mediamente basso, 1 femmina QIP estremamente basso; su 12; su 17 pazienti nella fascia d'età > 30 aa, 7 (4 M e 3 F) presentano QIP lievemente basso, 4 (3 M e 1 F) QIP moderatamente basso, 6 (3 M e 3 F) QIP estremamente basso (Grafico 13).

GRAFICO 10: PUNTEGGIO DI QIV NEI PAZIENTI

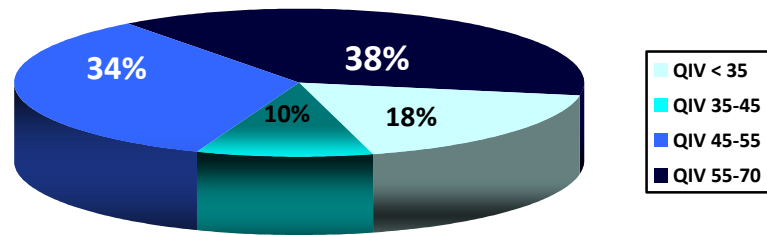


GRAFICO 11: DISTRIBUZIONE DEL QIV NELLE 3 FASCE D'ETA'

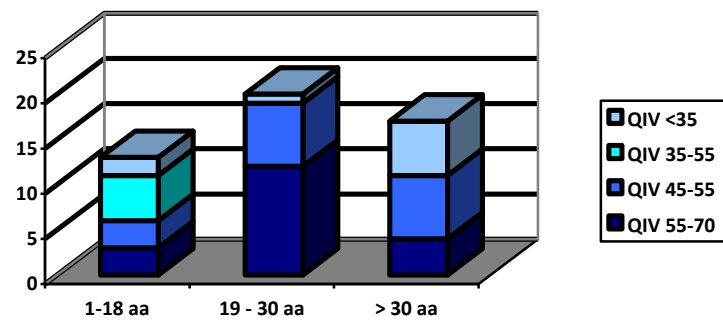


GRAFICO 12: PUNTEGGIO DI QIP NEI PAZIENTI

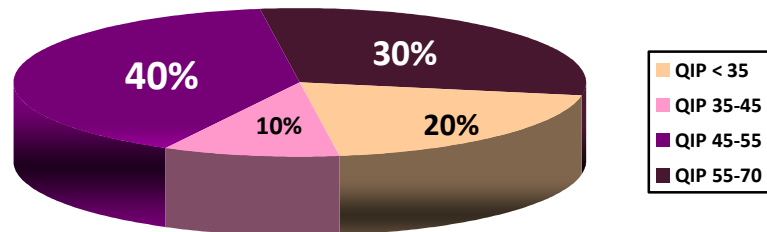
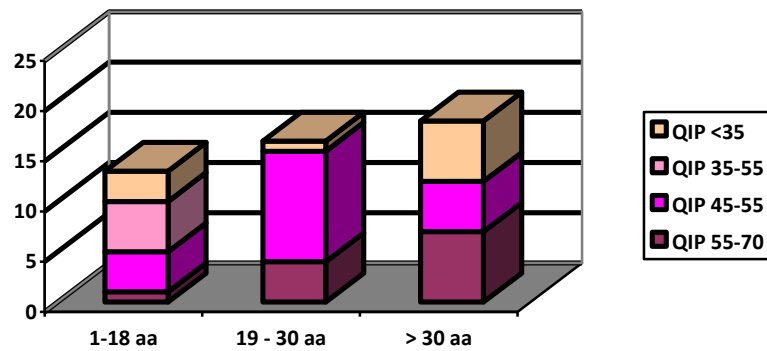


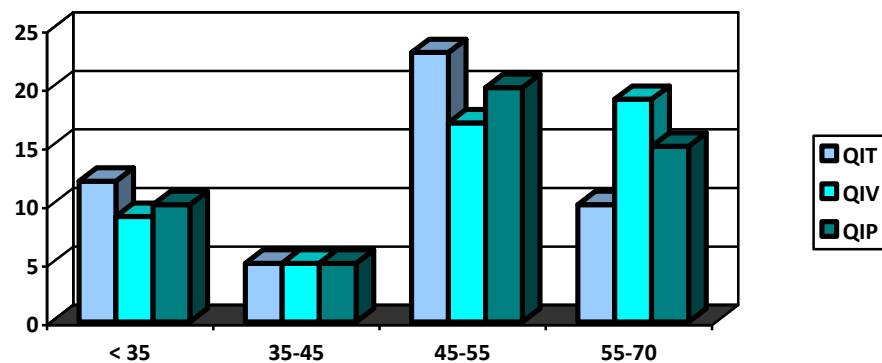
GRAFICO 13: DISTRIBUZIONE DEL QIP NELLE 3 FASCE D'ETA'



Si rileva inoltre che, in più della metà dei pazienti, ad un determinato grado di QIT corrisponde perfettamente lo stesso grado sia di QIV che di QIP (Grafico 14).

Dalla correlazione fra grado di RM e titolo anticorpale di antiTg e antiTPO, si evidenzia che, su 20 pazienti con aumento degli anticorpi, 5 (25%), 4 F e 1 M, presentano RM lieve, 10 (50%), 5 F e 5 M, RM medio, 1 femmina RM grave, 4 (20%) RM molto grave.

GRAFICO 14: CORRELAZIONE DI QIT, QIV e QIP NEI PAZIENTI



IV) Nell'ambito della valutazione della memoria, emerge in ciascuno dei 50 pazienti studiati, un deficit sia nella componente “*memoria di cifre*”(con punteggio medio 2 ± 1 rispetto a quello normale pari a 10), sia nelle componenti “verbale” (*span verbale*) e “spaziale” (con punteggio medio 3 ± 1 rispetto a quello normale di 6-7): i punteggi attribuiti ai soggetti relativamente alla memoria spaziale si avvicinano di più ai valori normali.

Nonostante in ogni paziente si denota un'ampia discrepanza fra età mentale ed età anagrafica, ciascuno soggetto ha manifestato sostanzialmente una buona capacità adattativa all'ambiente (*test di Vineland*) con buone prestazioni sociali e cognitive (*quoziente di sviluppo*), rispetto ai dati riportati in letteratura.

V) Nell'ambito della valutazione psicomotoria, le prove di dominanza/lateralità, disponibili di 40 pazienti su 50 arruolati (vedi Grafico 15 e 16), evidenziano: dominanza dell'arto superiore sinistro (AS sn) in 10 pazienti (25%), 5 M e 5 F, rispetto al 10-12% nella popolazione generale; dominanza dell'arto superiore destro (As dx) in 27 (67,5%), 14 M e 13 F; nessuna dominanza dell'arto superiore (As sn/dx) in 3 (7,5%), 2 M e 1 F.

GRAFICO 15: INCIDENZA di DOMINANZA ARTO SUPERIORE SINISTRO NEI PAZIENTI STUDIATI

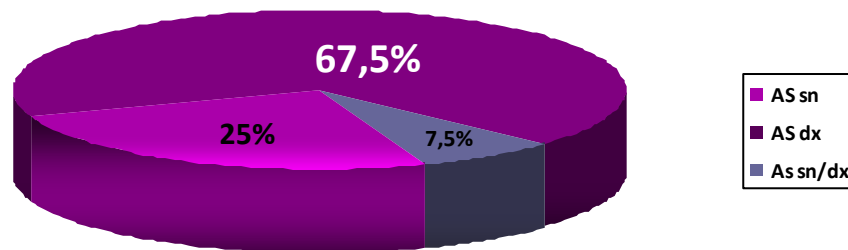
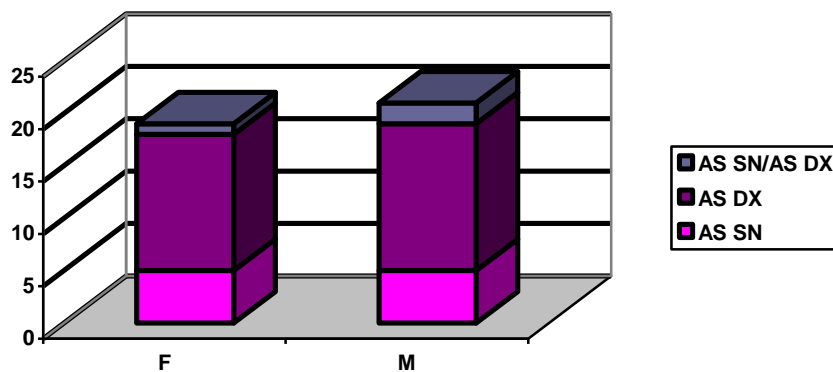
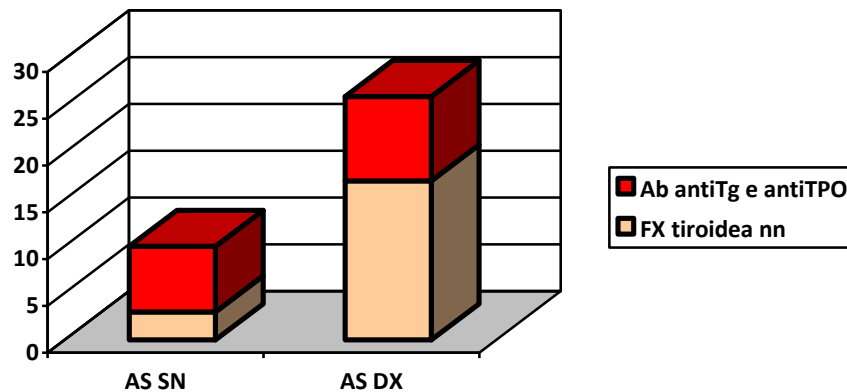


GRAFICO 16: LATERALITA' NEI PAZIENTI STUDIATI IN BASE AL SESSO



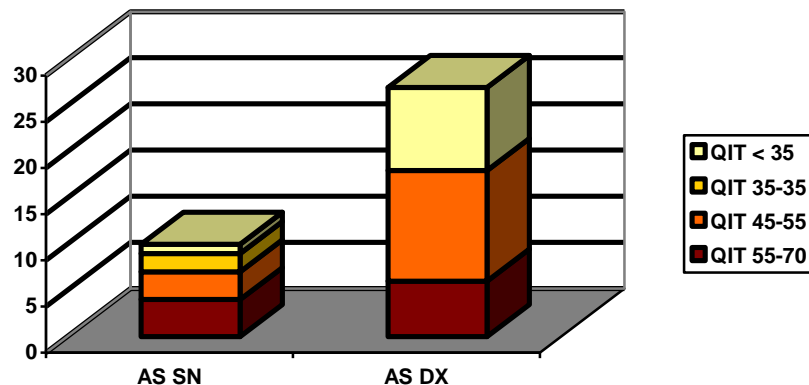
Su 10 pazienti con dominanza AS sn, 7 (70%), 3 M e 4 F, presentano aumentati livelli di Ab antiTPO e Ab antiTG, rispetto a 9 su 27 pazienti (33%) con dominanza AS dx ed aumentati livelli di anticorpi antitiroidei (Grafico 17).

GRAFICO 17: LATERALITA' NEI PAZIENTI STUDIATI IN BASE ALLA FUNZIONALITA' TIROIDEA



I soggetti con dominanza AS sn presentano prevalentemente RM da lieve a medio: su 10 pazienti con dominanza AS sn, 4 (3 F e 1 M) presentano RM lieve; 3 (2 M e 1 F) RM medio; 2 (1 M e 1 F) RM grave; 1 femmina RM molto grave. I pazienti con dominanza AS dx presentano prevalentemente RM da medio a molto grave: su 27 pazienti con dominanza AS dx, 6 (4 F e 3 M) presentano RM lieve; 12 (6 F e 6 M) RM medio, 9 (5 F e 4 M) RM molto grave (Grafico 18).

GRAFICO 18: CORRELAZIONE TRA QIT E LATERALITA' NEI PAZIENTI



Infine, relativamente al questionario DSQIID, un punteggio di 20 indicativo di demenza, è stato raggiunto in 3 pazienti, 2 F e 1 M, nella fascia d'età > 35 aa.

3.3 GENOTIPIZZAZIONE APOE4

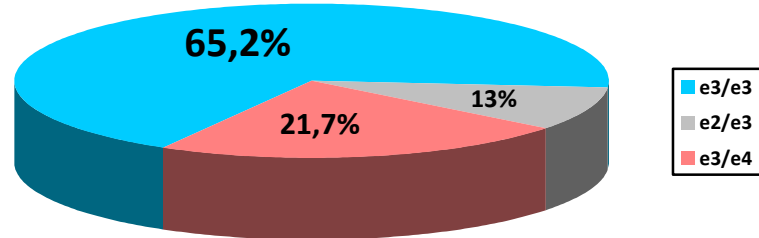
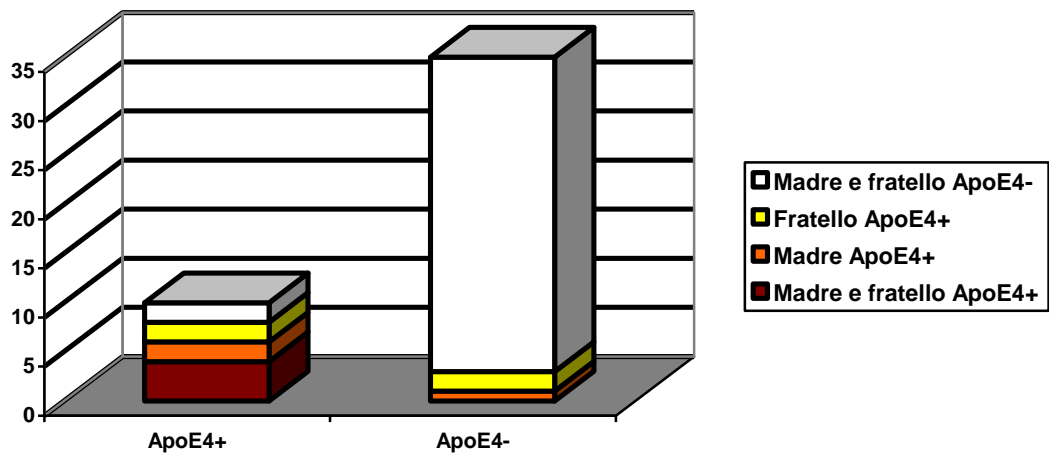
Per quanto riguarda i soggetti DS, è stato possibile effettuare la genotipizzazione di ApoE in 46 su 50 arruolati (Grafico 12): 30 pazienti (65,2%), 17 M e 13 F, presentano genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ (ApoE4 -); 10 pazienti (21,7%), 5 M e 5 F, presentano genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ (ApoE4+), i restanti 6 (13%), 4 M e 2 F, presentano genotipo $\epsilon 2/\epsilon 3$ (ApoE4 -).

Su 10 pazienti ApoE4 + , 3 (2 F e 1 M) presentano RM lieve, 3 maschi RM medio, 4 (3 F e 1 M) RM molto grave.

Per quanto riguarda le madri, è stato possibile effettuare la genotipizzazione di ApoE in 34 donne: 7 madri (20.6%) presentano genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$.

Per quanto riguarda i fratelli, è stato possibile effettuare la tipizzazione di ApoE in 34 soggetti: 8 (23,5%) presentano genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$.

In 4/10 pazienti ApoE4+ anche la madre ed il fratello sono ApoE4+, 2/10 pazienti ApoE4+ hanno solamente la madre ApoE4+, 2 solamente il fratello ApoE4+; nei restanti 2 pazienti ApoE4+ sia la madre che il fratello sono ApoE4- (Grafico 13).

GRAFICO 12: GENOTIPIZZAZIONE ApoE NEI PAZIENTI**GRAFICO 13: CORRELAZIONE GENOTIPO ApoE4 DEI PAZIENTI CON QUELLO DELLA MADRE E DEL FRATELLO**

4. PROSPETTIVE FUTURE

E' attualmente in corso un'altra indagine più mirata per la valutazione dello stress ossidativo nei pazienti inclusi nello studio: il sequenziamento completo del mtDNA (16569 bp).

Si ricorda che mtDNA viene ereditato solo dalla madre sia nei figli maschi che femmine e, per questo, il mtDNA materno diviene un riferimento ed uno standard (quindi il miglior controllo) per rilevare eventuali differenze e mutazioni che siano avvenute e si siano accumulate con l'età nel mtDNA del figlio affetto da DS.

L'eventuale raccolta di campioni di mtDNA del fratello/della sorella del soggetto con DS rappresenta un ulteriore controllo sulla presenza di mutazioni del mtDNA.

Qualsiasi sia il sesso del soggetto in esame questo non è rilevante perché è solamente la madre responsabile dell'eredità del mtDNA stesso.

Per questo una parte del campione ematico di ciascun paziente e dei rispettivi madre e fratello/sorella quando presente è stato utilizzato per l'estrazione del DNA così da poter procedere con il sequenziamento del mtDNA.

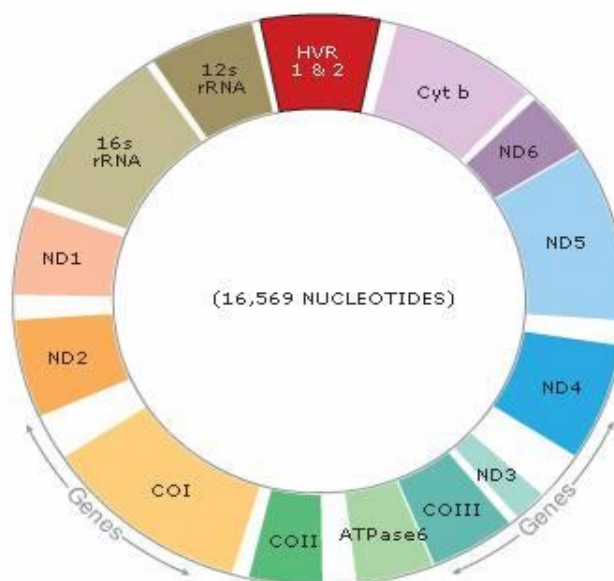
Si tratta di una metodica altamente complessa, comprendente più fasi di processamento e, quindi, richiede molto tempo nella sua esecuzione.

Il sequenziamento completo prevede i seguenti passaggi: 1) amplificazione dell'intero mtDNA; 2) purificazione dei prodotti di PCR; 3) reazione di sequenziamento; 4) purificazione della reazione di sequenziamento; 5) sequenziamento automatico con elettroforesi capillare; 6) analisi delle sequenze con software SeqScape v.2.5 (Applied Biosystems) per rinominare perfettamente le basi nucleotidiche ed allineare ed assemblare i frammenti di mtDNA sequenziati.

Le sequenze ottenute vengono infine confrontate con la prima sequenza completa del mtDNA umana, “sequenza di riferimento di Cambridge”, per evidenziare eventuali polimorfismi e mutazioni.

Sarà così possibile identificare nei pazienti con DS mutazioni a carico di mtDNA associate a danno ossidativo nel processo di degenerazione neuronale ed invecchiamento.

FIG.6: DNA MITOCONDRIALE (mtDNA) UMANO



CONCLUSIONI

Nell'ambito dei parametri biochimici indicatori di stress ossidativo e predittivi di invecchiamento precoce, dallo studio condotto emerge che il 40% dei nostri pazienti DS presenta una patologia tiroidea di tipo autoimmune con una lieve prevalenza nelle femmine rispetto ai maschi e nelle fasce d'età 1-18 aa e > 30 aa.

Non si segnala la presenza di altre patologie di carattere autoimmune, espressione di invecchiamento precoce del sistema immunitario.

Per quanto riguarda invece l'omocisteinemia, contrariamente ai dati riportati in letteratura, emerge una modesta prevalenza di livelli normali nei nostri pazienti (52%): questo è espressione di una buona capacità antiossidante. Tuttavia una percentuale relativamente elevata di soggetti (40%), senza particolari differenze di sesso, con una prevalenza nella fascia d'età 19-30 aa, presenta una lieve/moderata iperomocisteinemia che correla con un aumentato rischio di sviluppo di demenza.

Nella nostra casistica, inoltre, emerge una correlazione inversamente proporzionale tra omocisteinemia e livelli di anticorpi antitiroidei: infatti vi è un'elevata incidenza di soggetti con iperomocisteinemia e normali livelli di Ab antiTg e Ab antiTPO (75%), mentre tutti i pazienti con ridotta omocisteinemia presentano un aumento del titolo anticorpale ($p < 0.005$).

Infine nel 30% dei pazienti con iperomocisteinemia, anche il fratello/la sorella, come caso controllo, presenta un corrispettivo aumento dei livelli di tHcy: del resto mutazioni geniche responsabili di un aumento dei livelli plasmatici di tHcy potrebbero essere presenti non solo nei soggetti DS, ma anche nell'ambito della stessa famiglia (ricorrenza familiare o nella fratria).

Relativamente all'aumento dei livelli plasmatici di acido urico, come espressione di danno ossidativo, è stata riscontrata iperuricemia nel 26% dei nostri pazienti.

In conclusione, anche sulla base dell'assenza di alterazioni dei restanti parametri biochimici valutati (in particolare vitamina B12 e folati), si può affermare che la maggioranza dei nostri pazienti presenta un'adeguata capacità antiossidante.

Dalle valutazioni neurocognitive, psicologiche e psichiatriche, effettuate sui nostri pazienti, con particolare attenzione per i fattori indicativi e predittivi di degenerazione neuronale, emerge una prevalenza di RM da medio (QIT = 45-55) a molto grave (QIT < 35), senza particolari differenze di sesso; si rileva inoltre una lieve prevalenza di RM lieve e medio nei pazienti d'età 19-30 aa, mentre nei soggetti d'età 1-18aa e > 30 aa prevale RM da medio a molto grave; questo dato nei soggetti con età > 30 aa può correlare con il declino neurocognitivo.

Risultati analoghi si ottengono quando si valutano i punteggi relativi al QIV e al QIP: in più della metà dei pazienti, si rileva una perfetta corrispondenza tra grado di QIT, grado di QIV e grado di QIP.

Nei nostri pazienti non emergono correlazioni significative tra grado di RM e patologia tiroidea.

Infine, in base ai risultati del test di Vineland, si può affermare che ciascun paziente, nonostante il riscontro di un'ampia discrepanza fra età mentale ed età anagrafica, presenta un adattamento sociale buono e comunque superiore rispetto a quanto riportato in letteratura per la DS.

Per quanto riguarda i risultati delle prove di dominanza/lateralità nell'ambito della valutazione psicomotoria dei pazienti, si riscontra una prevalenza di dominanza dell'arto superiore destro (67,5%), anche se l'incidenza di dominanza dell'arto superiore sinistro nei nostri soggetti DS, in accordo con i dati della letteratura, è comunque superiore rispetto a quella del resto della popolazione (25% contro 10-12%).

Nella nostra casistica non emerge alcuna correlazione tra grado di RM e

dominanza/lateralità, mentre si rileva che nel 70% dei soggetti DS la dominanza dell'arto superiore sinistro si associa ad aumentati livelli di Ab antiTG e Ab antiTPO.

Nelle osservazioni condotte fino ad ora, un quadro neurologico specifico di demenza è stato identificato, tramite il questionario DSQIID, solamente in 3 pazienti, nella fascia d'età > 30 aa, di cui 2 di anni 60 e 1 di anni 33; il dato di una scarsa incidenza di demenza nella nostra casistica, potrebbe dipendere dalla prevalenza di soggetti DS giovani adulti con età inferiore rispetto a quella in cui, come riportato in letteratura, insorge il declino neurocognitivo della DS.

Risulta pertanto fondamentale un'osservazione neurologica evolutiva dei pazienti così da rilevare con il passare degli anni le progressive modificazioni neurocomportamentali che caratterizzano il decadimento neurocognitivo nel processo d'invecchiamento.

Attualmente i dati genetici relativi allo stress ossidativo e alla degenerazione neuronale a nostra disposizione sono rappresentati esclusivamente dalla genotipizzazione di ApoE, condotta solo su una parte del campione; i nostri pazienti sono in prevalenza ApoE4 negativi (65,2%) e, quindi, genotipicamente non predisposti a declino neurocognitivo e allo sviluppo di AD; nei pazienti ApoE4 positivi, in accordo con la letteratura, si evidenzia un grado di RM da medio a severo.

Il sequenziamento del mtDNA in corso consentirà di rilevare possibili mutazioni correlabili, sulla base dei quadri neurologici e neuropsichiatrici definiti, allo stress ossidativo e al declino neurocognitivo nei nostri soggetti DS con l'obiettivo di realizzare, specie nei pazienti più giovani, interventi terapeutici preventivi dell'insorgenza di demenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Canfield MA, Honein MA, Yuskiv N, Xing J, Mai CT, Collins JS, Devine O, Petrini J, Ramadhani TA, Hobbs CA: “*National estimates and race/ethnic-specific variation of selected birth defects in the United States, 1999–2001.*”- Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol., 76, 747–756 (2006).
2. Ghosh S, Feingold E, Dey SK: “*Etiology of Down syndrome: Evidence for consistent association among altered meiotic recombination, nondisjunction, and maternal age across populations.*”- Am J Med Genet A. Jul;149A(7):1415-20 (2009).
3. Allen EG, Freeman SB, Druschel C, Hobbs CA, O'Leary LA, Romitti PA, Royle MH, Torfs CP, Sherman SL: “*Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Project.*”- Hum Genet. Feb;125(1):41-52 (2009).
4. Morris JK, Wald NJ, Watt HC: “*Fetal loss in Down syndrome pregnancies.*”- Prenat. Diagn., 19, 142–145 (1999).
5. Savva GM, Morris JK, Multon DE, Alberman E: “*Maternal age-specific fetal loss rates in Down syndrome pregnancies.*”- Prenat Diagn Jun;26(6):499-504 (2006).
6. Glasson EJ, Sullivan SG, Hussain R, Petterson BA, Montgomery PD, Bittles AH: “*The changing survival profile of people with Down's syndrome: implications for genetic counseling.*”- Clin.Genet., 62, 390–393 (2002).
7. Gardiner K, Costa AC: “*The proteins of human chromosome 21.*”- Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet., 142C, 196–205 (2006).

8. Kuhn DE, Nuovo GJ, Martin MM, Malana GE, Pleister AP, Jiang J, Schmittgen TD, Terry AV Jr, Gardiner K, Head E, Feldman DS, Elton TS: "*Human chromosome 21-derived miRNAs are overexpressed in down syndrome brains and hearts.*"- Biochem Biophys Res Commun. 2008 Jun 6;370(3):473-7. Epub 2008 Apr 1.
9. Park J, Oh Y, Chung KC : "*Two key genes closely implicated with the neuropathological characteristics in Down syndrome: DYRK1A and RCAN1.*"- BMB Rep. Jan 31;42(1):6-15 (2009).
10. Canzonetta C, Mulligan C, Deutsch S, Ruf S, O'Doherty A, Lyle R, Borel C, Lin-Marq N, Delom F, Groet J: "*DYRK1A-dosage imbalance perturbs NRSF/REST levels, deregulating pluripotency and embryonic stem cell fate in Down syndrome.*"- Am. J. Hum. Genet., 83, 388–400 (2008).
11. Dowjat WK, Adayev T, Kuchna I, Nowicki K, Palminiello S, Hwang YW, Wegiel J: "*Trisomy-driven overexpression of DYRK1A kinase in the brain of subjects with Down syndrome.*"- Neurosci. Lett., 413, 77–81 (2007).
12. Ahn KJ, Jeong HK, Choi HS, Ryoo SR, Kim YJ, Goo JS, Choi SY, Han JS, Ha I, Song WJ: "*DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects.*"- Neurobiol. Dis., 22, 463–472 (2006).
13. Freeman SB, Bean LH, Allen EG, Tinker SW, Locke AE, Druschel C, Hobbs CA, Romitti PA, Royle MH, Torfs CP: "*Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project.*"- Genet. Med., 10,173–180 (2008).
14. Maslen CL, Babcock D, Robinson SW, Bean LJ, Dooley KJ, Willour VL, Sherman SL: "*CRELD1 mutations contribute to the occurrence of cardiac atrioventricular septal defects in Down syndrome.*"- Am. J. Med. Genet. A, 140, 2501–2505 (2006).

15. Williams AD, Mjaatvedt CH, Moore CS: "*Characterization of the cardiac phenotype in neonatal Ts65Dn mice.*" - Dev. Dyn., 237, 426–435 (2008).
16. O'Doherty A, Ruf S, Mulligan C, Hildreth V, Errington ML, Cooke S, Sesay A, Modino S, Vanes L, Hernandez D: "*An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with down syndrome phenotypes.*" - Science, 309, 2033–2037 (2005).
17. Roper RJ, Vanhorn JF, Cain CC, Reeves RH: "*A neural crest deficit in Down syndrome mice is associated with deficient mitotic response to Sonic hedgehog.*" - Mech. Dev (2008).
18. Groet J, McElwaine S, Spinelli M, Rinaldi A, Burtscher I, Mulligan C, Mensah A, Cavani S, Dagna-Bricarelli F, Basso G: "*Acquired mutations in GATA1 in neonates with Down's syndrome with transient myeloid disorder.*" - Lancet, 361, 1617–1620 (2003).
19. Forestier E, Izraeli S, Beverloo B, Haas O, Pession A, Michalova K, Stark B, Harrison CJ, Teigler-Schlegel A, Johansson B: "*Cytogenetic features of acute lymphoblastic and myeloid leukemias in pediatric patients with Down syndrome: an iBFM-SG study.*" - Blood, 111, 1575–1583 (2008).
20. Tunstall-Pedoe O, Roy A, Karadimitris A, de la FJ, Fisk NM, Bennett P, Norton A, Vyas P, Roberts I: "*Abnormalities in the myeloid progenitor compartment in Down syndrome fetal liver precede acquisition of GATA1 mutations.*" - Blood, 112, 4507–4511 (2008).
21. Weis S, Weber G, Neuhold A, Rett A: "*Down syndrome: MR quantification of brain structures and comparison with normal control subjects.*" - AJNR Am. J. Neuroradiol., 12, 1207–1211 (1991).

22. Aldridge K, Reeves RH, Olson LE, Richtsmeier JT: *“Differential effects of trisomy on brain shape and volume in related aneuploid mouse models.”* - Am. J. Med. Genet. A, 143A, 1060–1070 (2007).
23. Lorenzi HA, Reeves RH: *“Hippocampal hypocellularity in the Ts65Dn mouse originates early in development.”* - Brain Res., 1104, 153–159 (2006).
24. Guidi S, Bonasoni P, Ceccarelli C, Santini D, Gualtieri F, Ciani E, Bartesaghi R: *“Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome.”* - Brain Pathol., 18, 180–197 (2008).
25. Roper RJ, Baxter LL, Saran NG, Klinedinst DK, Beachy PA, Reeves RH: *“Defective cerebellar response to mitogenic Hedgehog signaling in Down syndrome mice.”* - Proc. Natl Acad. Sci. USA, 103, 1452–1456 (2006).
26. Contestabile A, Fila T, Ceccarelli C, Bonasoni P, Bonapace L, Santini D, Bartesaghi R, Ciani E: *“Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with Down syndrome and in Ts65Dn mice.”* Hippocampus, 17, 665–678 (2007).
27. Sawa A: *“Neuronal cell death in Down's syndrome.”* - J Neural Transm Suppl.;57:87-97 (1999).
28. Harashima C, Jacobowitz DM, Witta J, Borke RC, Best TK, Siarey RJ, Galdzicki Z: *“Abnormal expression of the G-protein-activated inwardly rectifying potassium channel 2 (GIRK2) in hippocampus, frontal cortex, and substantia nigra of Ts65Dn mouse: a model of Down syndrome.”* - J. Comp. Neurol., 494, 815–833 (2006).
29. Morice E, Andreae LC, Cooke SF, Vanes L, Fisher EM, Tybulewicz VL, Bliss TV: *“Preservation of long-term memory and synaptic plasticity despite short-term*

- impairments in the Tc1 mouse model of Down syndrome*". - Learn. Mem., 15, 492–500(2008).
30. Belichenk PV, Kleschevnikov AM, Salehi A, Epstein CJ, Mobley WC: "*Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: exploring genotype–phenotype relationships.*" - J. Comp. Neurol., 504, 329–345 (2007).
 31. Best TK, Cho-Clark M, Siarey RJ, Galdzicki Z: "*Speeding of miniature excitatory post-synaptic currents in Ts65Dn cultured hippocampal neurons.*" - Neurosci. Lett., 438, 356–361 (2008).
 32. Rachidi M, Lopes C: "*Mental retardation and associated neurological dysfunctions in Down syndrome: a consequence of dysregulation in critical chromosome 21 genes and associated molecular pathways.*" - Eur J Paediatr Neurol. May;12(3):168-82 (2008).
 33. Zigman WB, Lott IT: "*Alzheimer's disease in Down syndrome: neurobiology and risk.*" -Ment Retard Dev Disabil Res Rev.;13(3):237-46 (2007).
 34. Bush A, Beail N: "*Risk factors for dementia in people with down syndrome: issues in assessment and diagnosis.*" - Am J Ment Retard. Mar;109(2):83-97 (2004).
 35. Heyman A, Wilkinson WE, Hurwitz BJ: "*Alzheimer's disease: genetic aspect and associated clinical disorders.*" - Ann Neurol, 14:507-16 (1983).
 36. Schupf N, Kapell D, Lee JH, Ottman R, Mayeux R: "*Increased risk of Alzheimer's disease in mothers of adults with Down's syndrome.*" - Lancet, 344:353-6 (1994).
 37. St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D: "*The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21.*" - Science, Feb 20;235(4791):885-90 (1987).
 38. Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL.: "*Amyloid beta protein gene: cDNA,*

- mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus.*” - Science, Feb 20;235(4791):880-4 (1987).
39. Holland AJ, Hon J, Huppert FA, Stevens F: *“Incidence and course of dementia in people with Down’s syndrome: findings from a population-based study.”* - J. Intellect. Disabil. Res., 44, 138–146 (2000).
 40. Holland AJ: *“Down’s syndrome and the links with Alzheimer’s disease.”* - Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 59:111-114 (1995).
 41. Lott IT, Head E: *“Down syndrome and Alzheimer’s disease: a link between development and aging.”* - Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 7(3):172-8 (2001).
 42. Lee JH, Chulikavit M, Pang D, Zigman WB, Silverman W, Schupf N: *“Association between genetic variants in sortilin-related receptor 1 (SORL1) and Alzheimer’s disease in adults with Down syndrome.”* - Neurosci Lett, Sep 25; 425(2):105-9 (2007).
 43. Mehta PD, Capone G, Jewell A, Freedland RL: *“Increased amyloid beta protein levels in children and adolescents with Down syndrome.”* - J Neurol Sci, Mar 15; 254(1-2):22-7 (2007).
 44. Cosentino S, Scarmeas N, Helzner E, Glymour MM, Brandt J, Albert M, Blacker D, Stern Y. *“APOE epsilon 4 allele predicts faster cognitive decline in mild Alzheimer disease”*. Neurology. May 6;70(19 Pt 2):1842-9 (2008).
 45. Del Bo R, Comi GP, Bresolin N, Castelli E, Conti E, Degiuli A, Ausenda CD, Scarlato G. *“The apolipoprotein E epsilon4 allele causes a faster decline of cognitive performances in Down’s syndrome subjects.”* - J Neurol Sci. Jan;145(1):87-91(1997).
 46. Carrieri G, Bonafè M, De Luca M, Rose G, Varcasia O, Bruni A, Maletta R, Nacmias B, Sorbi S, Corsonello F, Feraco E, Andreev KF, Yashin AI, Franceschi C, De

- Benedictis G. *“Mitochondrial DNA haplogroups and APOE4 allele are non-independent variables in sporadic Alzheimer's disease.”* – Hum Genet. Mar;108(3):194-8 (2001).
47. Schapiro MB, Haxby JV, Grady CL: *“Nature of mental retardation and dementia in Down Syndrome: study with PET, CT, and neuropsychology.”* - Neurobiol Aging, Nov-Dec; 13(6):723-34 (1992).
48. Kesslak JP, Nagata SF, Lott I, Nalcioğlu O.: *“Magnetic resonance imaging analysis of age-related changes in the brains of individuals with Down's syndrome.”* – Neurology, 44:1039-45 (1994).
49. Murata T, Koshino Y, Omori, et al.: *“In vivo proton magnetic resonance spectroscopy study on premature ageing in adult Down's syndrome.”* - Biol Psychiatry, 34:290-7 (1993).
50. Kusters MA, Verstegen RH, Gemen EF, de Vries E: *“Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review.”* - Clin Exp Immunol, May; 156(2):189-93 (2009).
51. Cocchi G, Mastrocola M, Capelli M, Bastelli A, Vitali F, Corvaglia L: *“Immunological patterns in young children with Down syndrome: is there a temporal trend ?”* – Acta Paediatr. Oct; 96 (10): 1479-82 (2007).
52. Kusters MA, Gemen EF, Verstegen RH, Wever PC, de Vries E: *“Both normal memory counts and decreased naive cells favor intrinsic defect over early senescence of Down syndrome T-lymphocytes.”* Pediatr Res. 2010 Jan 21.
53. Da Rosa Utiyama SR, Nisihara RM, Nass FR, Oliveira NP, Fiedler PT, de Messias-Reason IT: *“Autoantibodies in patients with Down syndrome: early senescence of the*

- immune system or precocious markers for immunological diseases?"* - J Paediatr Child Health, Apr; 44(4):182-6 (2008).
54. Cossarizza A, Monti D, Montagnani G, Ortolani C, Masi M, Zannotti M, Franceschi C: *"Precocious aging of the immune system in Down syndrome: alteration of B lymphocytes, T-lymphocyte subsets, and cells with natural killer markers."* - Am J Med Genet Suppl, 7:213-8 (1990).
 55. Cossarizza A, Ortolani C, Forti E, Montagnani G, Paganelli R, Zannotti M, Marini M, Monti D, Franceschi C. *"Age-related expansion of functionally inefficient cells with markers of natural killer activity in Down's syndrome."* - Blood, Mar 15;77(6):1263-70 (1991).
 56. Druzhyna N, Nair RG, LeDoux SP, Wilson GL: *"Defective repair of oxidative damage in mitochondrial DNA in Down's syndrome."* - Mutat Res, Nov 12; 409(2):81-9 (1998).
 57. Biesalski HK: *"Free radical theory of aging."* - Curr Opin Clin Nutr Metab Care, Jan; 5(1):5-10 (2002).
 58. Wei YH, Ma YS, Lee HC, Lee CF, Lu CY: *"Mitochondrial theory of aging matures--roles of mtDNA mutation and oxidative stress in human aging."* - Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei), May; 64(5):259-70 (2001).
 59. Wei YH, Lee HC: *"Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging."* - Exp Biol Med (Maywood), Oct; 227(9):671-82 (2002).
 60. Lee HC, Wei YH: *"Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation, and Apoptosis in Aging."* - Exp Biol Med (Maywood), May;232(5):592-606 (2007).
 61. Jovanovic SV, Clements D, MacLeod K.: *"Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome."* - Free Radic Biol Med. Dec;25(9):1044-8 (1998).

62. Pallardó FV, Degan P, d'Ischia M, Kelly FJ, Zatterale A, Calzone R, Castello G, Fernandez-Delgado R, Dunster C, Lloret A, Manini P, Pisanti MA, Vuttariello E, Pagano G.: *"Multiple evidence for an early age pro-oxidant state in Down Syndrome patients."* – Biogerontolog, Aug; 7(4):211-20 (2006).
63. Zitnanová I, Korytár P, Sobotová H, Horáková L, Sustrová M, Pueschel S, Duracková Z.: *"Markers of oxidative stress in children with Down syndrome."* - Clin Chem Lab Med, 44(3):306-10 (2006).
64. Muchová J, Sustrová M, Garaiová I, Liptáková A, Blazíček P, Kvasnicka P, Pueschel S, Duracková Z.: *"Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients."* - Free Radic Biol Med, Aug 15;31(4):499-508 (2001).
65. Finkelstein JD: *"The metabolism of homocysteine: pathways and regulation."* - Eur J Pediatr; 157(Suppl 2):S40-S44 (1998).
66. Varga E.A, Sturm A.C, Misita C.P, Moll S.: *"Homocysteine and MTHFR Mutations. Relation to Thrombosis and Coronary Artery Disease."* - Circulation;111:e289-e293 (2005).
67. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG.: *"A quantitative assesment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes."* - JAMA; 274:1049-1057 (1995)
68. Hankey GJ, Eikelboom JW.: *"Homocysteine and vascular disease."* - Lancet 1999; 354:407-413.

69. Gurol ME, Irizarry MC, Smith EE, Raju S, Diaz-Arrastia R, Bottiglieri T, Rosand J, Growdon JH, Greenberg SM. *"Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease."* - N Engl J Med. Feb 14;346(7):476-83 (2002).
70. Pogribna M, Melnyk S, Pogribny I, Chango A, Yi P, James SJ: *"Homocysteine metabolism in children with Down syndrome: in vitro modulation."* - Am J Hum Genet. Jul;69(1):88-95 (2001).
71. Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC: *"The MTR A2756G polymorphism is associated with an increase of plasma homocysteine concentration in Brazilian individuals with Down syndrome."*- Braz J Med Biol Res. Jan;41(1):34-40 (2008).
72. Peeters MA, Megarbane A, Cattaneo F, Rethore MO, Lejeune J: *"Differences in purine metabolism in patients with Down's syndrome."* - J Intellect Disabil Res 37:491–505 (1993).
73. Zitnanová I, Korytár P, Aruoma OI, Sustrová M, Garaiová I, Muchová J, Kalnovicová T, Püeschel S, Duracková Z: *"Uric acid and allantoin levels in Down syndrome: antioxidant and oxidative stress mechanisms?"* - Clin Chim Acta, Mar; 341(1-2):139-46 (2004).
74. Gérard-Desplanches A, Deruelle C, Stefanini S, Ayoun C, Volterra V, Vicari S, Fisch G, Carlier M: *"Laterality in persons with intellectual disability II. Hand, foot, ear, and eye laterality in persons with Trisomy 21 and Williams-Beuren syndrome."* - Dev Psychobiol. Sep;48(6):482-91 (2006).
75. Deb S, Hare M, Prior L, Bhaumik S: *"Dementia screening questionnaire for individuals with intellectual disabilities."* - Br J Psychiatry, May; 190:440-4 (2007).